

## 明細書

## 形質転換細胞による IgM の產生とその定量方法

5 技術分野

本発明は、遺伝子操作技術を利用する IgM の製造に関する。

背景技術

多くの高等動物の免疫グロブリンには、5種類の異なったクラス IgG、IgA、IgM、IgD、および IgE が存在する。各クラスの免疫グロブリンは、大きさ、電荷、アミノ酸組成、糖含量等の性状が異なっている。これらのクラスの中で、IgM は血漿免疫グロブリン全体の約 10%を占めている。IgM は、複雑な抗原性を持つ細胞膜抗原、感染性微生物、あるいは溶解性抗原に対して產生される初期抗体の主成分である。

ヒト IgM は、生体内では、通常、5量体構造を有している。IgM の 5量体構造を構成する 5つのサブユニットは、IgG に類似した 4本鎖構造からなっている。IgM の H鎖である  $\mu$  鎖は IgG の H鎖である  $\gamma$  鎖とアミノ酸配列が異なる以外にも次のような相違を有する。

$\mu$  鎖は、定常領域のドメインを、 $\gamma$  鎖よりも一つ余分に持っている。

$\mu$  鎖は、オリゴ糖鎖の数が  $\gamma$  鎖と比較して 4箇所多い。

IgM は、IgG には見られない J鎖と呼ばれるポリペプチド鎖を有する。J鎖は、IgM が抗体產生細胞から分泌される前に、 $\mu$  鎖の会合を補助すると考えられている。

近年、モノクローナル抗体技術および組換え DNA 技術の進歩により、純粋な免疫グロブリンを大量に生産することが可能になった。更に遺伝子組み換え技術は、キメラ抗体やヒト化抗体生産を可能にした。キメラ抗体とは、可変領域を異なる

種に由来する可変領域に組み換えた構造を有する抗体である。たとえば、ヒト以外の動物種の可変領域とヒト抗体の定常領域を有する「キメラ抗体」（文献 1 / Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, (1984) 81:6851）が公知である。更に、他の動物種の相補性決定領域 (complementarity determining regions; CDR) をヒトイムノグロブリンに移植したヒト化抗体も公知である（文献 2 / Nature (1986) 321:521）。

実際に、抗腫瘍抗体に関して列挙すると、抗 CD20 ヒトキメラ抗体であるリツキサン (Rituxan®: IDEC 社) や抗 HER2/neu ヒト化抗体であるハーセプチノン (Herceptin®: Genentech 社) が臨床試験を終了し、既に承認・販売されている。IgG および IgM のエフェクター機能として抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性と表記する）や補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性と表記する）が知られている。IgM の CDC 活性は IgG と比較して高いことから、CDC 活性を主薬効とする抗腫瘍抗体となる可能性が極めて高いと思われる。しかし上述のとおり、IgM は IgG と異なり多量体を形成する。そのため、組換え体 IgM を工業的規模で生産することは困難であると考えられていた。

IgM 組換え体については、非リンパ球細胞を用いた生産系についていくつかの報告がある。C6 グリオーマ細胞、CHO 細胞、あるいは HeLa 細胞に IgM H鎖、L鎖の遺伝子を導入し、多量体の形成が確認されたが、CHO 細胞の産生量は非常に低いことが確認されている（文献 3 / EMBO J. (1987) 9;2753）（特許文献 1 / WO89/01975）。さらに CHO 細胞において、IgM H鎖、L鎖それぞれを発現ベクターに組み込み、共発現させることにより、IgM 産生株が取得されている（文献 4 / J. Immunol. (1990) 145;3011）（文献 5 / Human Antibodies (1997) 8;137）。これらの報告でも CHO 細胞が産生する組換え IgM は多量体を形成しているが、5 量体および 6 量体の存在比などについては明確にされていない。

IgM の組み換え体の多量体構造が確認されていない最大の理由は、解析技術が確立されていないことである。すなわち公知のイムノグロブリンの解析方法では、多量体構造を有する IgM を正しく分析することはできなかった。たとえば蛋白質

- 3 -

の分離および同定技術として、SDS-PAGE のようなゲル電気泳動が知られている。しかし IgM は分子量約 100 万を有する巨大分子である。そのため一般的な方法では多量体構造（5 量体と 6 量体）を定量的に解析することは困難である。

報告されている IgM の多量体構造の分析法においては、RI 標識した IgM を用いて非還元 SDS-PAGE を行なっている（文献 6 ／ J. Immunol. (1994) 152;1206）。IgM を医薬品として開発するためには、製造過程において IgM の多量体構造を分析することができる技術が必要である。具体的には、製造細胞の選定、細胞培養のモニタリング、精製、原体製造、製剤製造のあらゆる工程において IgM の多量体構造の分析が必要である。しかし RI を用いる方法では、これら全ての工程の評価に対応することは現実的ではない。

〔文献 1〕 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, (1984) 81:6851

〔文献 2〕 Nature (1986) 321:521

〔文献 3〕 EMBO J. (1987) 9;2753

〔文献 4〕 J. Immunol. (1990) 145;3011

〔文献 5〕 Human Antibodies (1997) 8;137

〔文献 6〕 J. Immunol. (1994) 152;1206

〔特許文献 1〕 WO89/01975

### 発明の開示

本発明は、高い IgM 産生能を有する細胞の提供を課題とする。また本発明は、5 量体または 6 量体構造を有する IgM の供給を可能とする技術の提供を課題とする。更に本発明は、IgM の多量体構造あるいは会合体の解析方法の提供を課題とする。

これまでの IgM 研究は、多くがミエローマ、ハイブリドーマ、B リンパ腫細胞株などのリンパ球細胞を使用して行われてきた。B 細胞分化の各過程の細胞株に J 鎮遺伝子を導入することにより、J 鎮を発現していない細胞が分泌する IgM は

6量体を形成し、J鎖を発現している細胞が分泌する IgM は 5量体を形成することが確認された (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, (1995) 92:2884)。また、Bリンパ腫細胞株および Hybridoma が分泌する IgM の 5量体、6量体成分を分画し、6量体成分が 5量体成分と比較して CDC 活性が高いことが示された (Eur. J. Immunol. 1., (1990) 20:1971) (J. Immunol. (1998) 160;5979)。このように CDC 活性と IgM のコンホメーションとの関係は重要であると考えられている。しかし、リンパ球細胞が分泌した IgM の 5量体、あるいは 6量体成分を大量に取得することは困難である。

取得が困難な蛋白質を大量に入手するための手法として、しばしば遺伝子組み換え技術が利用される。しかし IgM については、組み換え体においてその多量体構造の構築を可能とする技術が見出されていなかった。そこで本発明者らは、IgM を多量に供給することができる細胞、並びに多量体構造を有する IgM の產生を可能とする技術を確立することを目的として研究を重ねた。

その結果、本発明者らは、H鎖、L鎖、および J鎖をコードする遺伝子を適当なベクター上に配置し、それを宿主細胞に形質転換することにより、5量体の IgM が取得できることを見出した。また本発明者は、形質転換細胞が J鎖の発現を伴わない場合には、IgM が主として 6量体を形成することを明らかにした。更に、これらの発現細胞の IgM 產生量が極めて高いことを確認して本発明を完成了。すなわち本発明は、以下の IgM 產生細胞、IgM 产生方法、並びにこれらの細胞あるいは方法によって得ることができる IgM 多量体に関する。更に本発明は、IgM 多量体構造あるいは IgM 会合体の解析方法を提供する。

- [1] 100 mg/L 以上の IgM を產生できる形質転換細胞。
- [2] 35 pg /cell /day 以上の IgM を產生できる形質転換細胞。
- [3] 真核細胞である [1] または [2] に記載の形質転換細胞。
- [4] 原核細胞である [1] または [2] に記載の形質転換細胞。
- [5] 哺乳動物細胞である [3] に記載の形質転換細胞。

- 5 -

[6] 株化細胞である〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の形質転換細胞。

[7] 非リンパ球系細胞株である〔6〕に記載の形質転換細胞。

[8] CHO 細胞株である〔7〕に記載の形質転換細胞。

[9] 同じベクター上に(1)IgM H鎖をコードする塩基配列および(2)IgM L鎖をコードする塩基配列の両方を有する発現ベクター、あるいは前記遺伝子(1)および(2)を含む遺伝子断片。

[10] 同じベクター上に(1)IgM H鎖をコードする塩基配列、(2)IgM L鎖をコードする塩基配列、および(3)IgM J鎖をコードする塩基配列を有する発現ベクター、あるいは前記遺伝子(1)、(2)、および(3)を含む遺伝子断片。

10 [11] 転写調節配列により IgM の分泌が制御される〔9〕または〔10〕に記載の発現ベクターあるいは遺伝子断片。

[12] 転写調節配列が、アデノウイルス 2 型主後期プロモーター、シミアンウイルス 40 初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス LTR プロモーター、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子 1  $\alpha$  プロモーター、ウシ成長ホルモンプロモーター、 $\beta$  アクチン遺伝子プロモーター、および CAG プロモーターからなる群から選択される〔11〕に記載の発現ベクターあるいは遺伝子断片。

15 [13] 転写調節配列が、シミアンウイルス 40 初期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子 1  $\alpha$  プロモーター、および CAG プロモーターからなる群から選択される〔12〕に記載の発現ベクターあるいは遺伝子断片。

20 [14] 〔9〕～〔13〕のいずれかに記載のベクターあるいは遺伝子断片で形質転換された形質転換細胞。

25 [15] 〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の形質転換細胞から選択される、〔1〕に記載の形質転換細胞。

[16] 発現ベクターまたは遺伝子断片が、J鎖をコードする塩基配列を含んで  
いる〔14〕または〔15〕に記載の形質転換細胞。

[17] 前記ベクターまたは遺伝子断片が IgM J鎖をコードする塩基配列を有し、  
かつ60%以上の含量を持つ5量体 IgMを産生する〔14〕～〔16〕の  
5 いずれかに記載の形質転換細胞。

[18] 80%以上の含量を持つ5量体 IgMを産生する〔17〕に記載の形質転  
換細胞。

[19] 前記ベクターまたは遺伝子断片が IgM J鎖をコードする塩基配列を有さ  
ず、かつ50%以上の含量を持つ6量体 IgMを産生する〔14〕または  
10 〔15〕に記載の形質転換細胞。

[20] 80%以上の含量を持つ6量体 IgMを産生する〔19〕に記載の形質転  
換細胞。

[21] 前記ベクターまたは遺伝子断片が IgM J鎖をコードする塩基配列を有し、  
かつ産生する5量体と6量体の比（5量体／6量体比）が1.5以上であ  
15 る IgMを産生する〔14〕～〔16〕のいずれかに記載の形質転換細胞。

[22] 前記ベクターまたは遺伝子断片が IgM J鎖をコードする塩基配列を有さ  
ず、かつ産生する6量体と5量体の比（6量体／5量体比）が1.5以上  
である IgMを産生する〔14〕または〔15〕に記載の形質転換細胞。

[23] IgM H鎖および IgM L鎖をコードする遺伝子を含む発現ベクターまたは  
20 遺伝子断片が、J鎖をコードする塩基配列を含まず、かつ共形質転換によ  
り J鎖をコードする塩基配列が発現可能に導入されている〔14〕または  
〔15〕に記載の形質転換細胞。

[24] 〔1〕～〔8〕、並びに〔14〕～〔23〕のいずれかに記載の細胞を  
培養し、IgMを採取する工程を含む IgMを製造する方法。

25 〔25〕 〔1〕～〔8〕、並びに〔14〕～〔23〕のいずれかに記載の細胞培  
養物の培養上清から IgMを精製する工程を含む、実質的に純粋な IgMを製

造する方法。

[26] [24] に記載の方法により得られる IgM。

[27] [25] に記載の方法により得られる実質的に純粹な IgM。

[28] ヒト抗体、マウス抗体、ヒトキメラ抗体またはヒト化抗体である [25] または [27] に記載の IgM。

[29] 実質的に純粹な 5 量体あるいは 6 量体である [26] ~ [28] のいずれかに記載の IgM。

[30] CHO 細胞が付加する糖鎖を有する実質的に純粹な 5 量体または 6 量体 IgM。

10 [31] 抗糖鎖抗体である [26] ~ [30] のいずれかに記載の IgM。

[32] 抗ガングリオシド抗体である [31] に記載の IgM。

[33] 抗 GM 2 または GM 3 抗体である [32] に記載の IgM。

[34] 配列番号：1 に記載の塩基配列、または配列番号：2 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

15 [35] 配列番号：3 に記載の塩基配列、または配列番号：4 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

[36] [34] に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む単離された蛋白質。

20 [37] [35] に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む単離された蛋白質。

[38] [36] に記載の蛋白質と [37] に記載の蛋白質を構成単位として含む IgM。

[39] 更に IgM J鎖を含む [38] に記載の IgM。

[40] 5 量体である [39] に記載の IgM。

25 [41] 配列番号：19 に記載の塩基配列、または配列番号：20 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

[4 2] 配列番号：2 1に記載の塩基配列、または配列番号：2 2に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

[4 3] [4 1] に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む単離された蛋白質。

5 [4 4] [4 2] に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む単離された蛋白質。

[4 5] [4 3] に記載の蛋白質と [4 4] に記載の蛋白質を構成単位として含む IgM。

[4 6] 更に IgM J鎖を含む [4 5] に記載の IgM。

10 [4 7] 5量体である [4 6] に記載の IgM。

[4 8] [2 6] ~ [3 3] 、 [3 8] 、および [4 5] のいずれかに記載の IgM を含有する医薬組成物。

[4 9] 80%以上の5量体 IgM を含有する医薬組成物。

[5 0] 50%以上の6量体 IgM を含有する医薬組成物。

15 [5 1] 80%以上の6量体 IgM を含有する [5 0] に記載の医薬組成物。

[5 2] 5量体／6量体比が1.5以上である IgM を含有する医薬組成物。

[5 3] 6量体／5量体比が1.5以上である IgM を含有する医薬組成物。

[5 4] 次の a)-c)からなる群から選択された少なくとも1つの条件を満たすポリ

20 アクリルアミドゲルを担体として SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって IgM を分離する工程を含む、 IgM の多量体を分析する方法。

a)高温で重合させたポリアクリルアミドゲル、

b)高濃度の過硫酸アンモニウム、及び、グリセロールを含有するポリアクリ

ルアミドゲル、および

c)重合させる前に攪拌、脱泡により均一化したポリアクリルアミドゲル、

25 [5 5] 条件 a)における温度が37°C以上である [5 4] に記載の方法。

[5 6] 条件 b)における過硫酸アンモニウムの濃度が0.25%以上である [5

## 4] に記載の方法。

[57] ポリアクリルアミドゲルが、前記a)-c)からなる群から選択された少なくとも2つの条件を満たすポリアクリルアミドゲルである[54]に記載の方法。

5 [58] ポリアクリルアミドゲルが、前記a)-c)の全ての条件を満たすポリアクリルアミドゲルである[54]に記載の方法。

[59] 電気泳動用のバッファーが Tris-acetate SDS 泳動バッファーである[54]に記載の方法。

10 [60] IgM の多量体が、IgM の5量体および／または6量体である[54]に記載の方法。

[61] IgM の会合体を分析することを特徴とする[54]に記載の方法。

[62] RI を使用しないことを特徴とする[54]に記載の分析方法。

[63] 電気泳動後に分離された IgM の多量体を定量する工程を含む、[54]に記載の方法。

15 [64] 次のa)-c)からなる群から選択された少なくとも1つの条件を満たすポリアクリルアミドゲルからなる、IgM の多量体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離するための電気泳動用ゲル。

a)高温で重合させたポリアクリルアミドゲル、

b)高濃度の過硫酸アンモニウム、及び、グリセロールを含有するポリアクリルアミドゲル、および

c)重合させる前に攪拌、脱泡により均一化したポリアクリルアミドゲル、

[65] 次のa)-c)からなる群から選択された少なくとも1つの工程を含む、IgM の多量体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離するための電気泳動用ゲルの製造方法。

25 a)アクリルアミドを高温で重合させる工程、

b)アクリルアミドに高濃度の過硫酸アンモニウムを添加する工程、および

- 10 -

c)重合させる前にアクリルアミドを攪拌、および脱泡により均一化する工程、  
本発明は、100mg/L以上のIgMを產生する形質転換細胞を提供する。本発  
明における形質転換細胞とは、外来性のIgM遺伝子を発現可能に保持した細胞を  
言う。100mg/L以上のIgMの產生とは、IgM產生細胞がその培養物1L中に、  
5 100mg以上のIgMを蓄積しうることを言う。培養物中のIgMの產生量は、ELI  
SAなどによって測定することができる。本発明において、IgMの蓄積量は、通常  
100mg/L以上、好ましくは120mg/L以上、更に好ましくは150mg~30  
0mg/Lである。多量体であるために高度な產生量を実現しにくいと考えられて  
いたIgMにおいて、本発明の形質転換細胞の產生量はきわめて高い水準にあると  
10 言って良い。

細胞融合法によって樹立されたハイブリドーマが產生するモノクローナル抗体  
は、高い產生量を期待できるIgGにおいても一般に数mg~数10mg/Lとされて  
いる。つまり本発明の形質転換細胞は、ハイブリドーマの標準的なモノクローナ  
ル抗体の產生量をはるかに上回る量のIgMを產生する。

15 本発明において、IgMとはH鎖の定常領域としてμ鎖の定常領域を有し、か  
つ5量体または6量体の構造を持つイムノグロブリンを言う。一方、本発明にお  
けるIgMを構成する可変領域の由来は限定されない。したがって、μ鎖由来の  
可変領域に加えて、IgG由来の可変領域やその部分構造を含むことができる。可  
変領域の部分構造としては、フレームワークやCDRを示すことができる。なお本  
20 発明におけるIgMは、形質転換細胞に導入された外来性のIgM遺伝子の発現産物  
を言う。

更に、本発明のIgMを構成する定常領域が由来する動物種も限定されない。つ  
まり本発明のIgMは、IgMタイプのイムノグロブリンを有するあらゆる動物種に  
由来するIgM定常領域を含む。IgMを体内への投与に用いる場合には、少なくと  
25 もその定常領域は、投与対象となる種と同じ種に由来することが望ましい。した  
がって、ヒトへの投与を目的とする場合には、少なくとも定常領域がヒト由来で

- 11 -

あることが望ましい。ヒト由来の定常領域と、他の動物種、あるいはヒト由来であるが他の個体に由来する可変領域とで構成される IgM は、キメラ抗体と呼ばれる。

定常領域に加えて、可変領域のフレームワークもヒト由来とした IgM は、ヒト 5 への投与用の IgM として更に好ましい IgM である。可変領域のフレームワークの構造を維持し、CDR のみを他の動物種の抗体と組み換えられた抗体は、ヒト化抗体と呼ばれている。

また本発明は 35 pg /cell /day 以上の IgM を產生する形質転換細胞を提供する。本発明の望ましい形質転換細胞において、1 細胞、1 日あたりの IgM 產生 10 量は、通常 35 pg 以上、好ましくは 40 pg 以上である。細胞あたりの IgM の產生量は、培養物中に蓄積された IgM の量と、培養物を構成する形質転換細胞の数に基づいて明らかにできる。形質転換細胞がクローニングされた細胞である場合には、こうして決定された 1 細胞あたりの IgM 產生量は、当該細胞集団を構成する全ての細胞が等しく有している特性であるとみなすことができる。

IgM は、通常、細胞内での発現とコンフォーメーションの獲得を経て、培養上清中へ分泌される。しかし、細胞の破碎等により、機能的なコンフォーメーションを有する IgM を回収できるのであれば、IgM が細胞内に蓄積されたままであっても良い。また、回収された IgM 分子に何らかの処理により機能的なコンフォーメーションを与えることが可能ならば、必ずしも培養物中で IgM としての活性を 20 示していなくてもよい。

本発明が提供する高度な IgM 產生能を有する形質転換細胞は、 $\mu$  鎖を構成する H 鎖と L 鎖の遺伝子を同一のベクター上に発現可能に配置したベクターまたは遺伝子断片を、適当な宿主細胞に形質転換することによって得ることができる。本発明の形質転換細胞を得ることができる宿主細胞とそれを形質転換するための 25 方法について以下に述べる。

本発明の形質転換細胞を得ることができる宿主細胞と、それを形質転換するた

- 12 -

めの方法について以下に述べる。まず、目的とする H鎖と L鎖をコードする DNA を発現ベクターへ組み込む。発現ベクターに組み込む遺伝子として、更に J鎖をコードする遺伝子を組み合せることもできる。これらの遺伝子は、発現制御領域の制御下に発現するよう発現ベクターに組み込まれる。

5 IgM の H鎖、L鎖あるいは J鎖をコードする遺伝子 (IgM 遺伝子) を取得する方法は公知である。以下、「IgM 遺伝子」は、IgM を構成する H鎖、L鎖、あるいは J鎖の遺伝子のいずれかを示す用語として用いる。

まずヒト J鎖をコードする遺伝子はクローニングされ、その構造が明らかにされている (GenBank Accession No. M12759、Max & Korsmeyer, J. Exp. Med. (1985)

10 161:832-849) 明らかにされた塩基配列情報に基づいて、IgM 產生細胞の mRNA を  
録型として、J鎖をコードする遺伝子を取得することができる。

たとえば実施例に記載した J鎖増幅用プライマー J-f1 および J-r1 を利用して、  
J鎖をコードする DNA を増幅することができる。実施例において単離された J鎖  
をコードする cDNA の塩基配列は配列番号：5 に、またこの塩基配列がコードす  
15 るアミノ酸配列を配列番号：6 に示した。

次に H鎖または L鎖の遺伝子について述べる。一般にイムノグロブリンの遺伝  
子の取得においては、その可変領域を含む領域をコードする塩基配列が重要で  
ある。イムノグロブリンの定常領域の構造は保存されている。そのため、いった  
んクローニングされれば、可変領域を組み換えることによって、目的とする抗原  
20 結合活性を有するイムノグロブリンを再構成できると考えられている。したがつ  
て、通常は、可変領域や CDR の遺伝子を取得し、先にクローニングされた定常領  
域やフレームワークに移植することによって、イムノグロブリン全体をコードす  
る塩基配列が構築される。IgM を構成する  $\mu$  鎖の H鎖あるいは L鎖の定常領域  
の構造は既に明らかにされている。

25  $\mu$  鎖定常領域: Dorai & Gillies, Nucleic Acids Res. (1989) 17:6412

$\kappa$  鎖定常領域: Hietter et al., Cell (1980) 22:197-207

- 13 -

$\gamma$ 鎖定常領域: Hieter et al., Nature (1981) 294: 536-540

更に本発明における IgM は、定常領域を改変した IgM が含まれる。たとえば、  
IgM を構成する  $\mu$ 鎖の H鎖あるいは L鎖の定常領域を改変して、その CDC 活性  
を高められる可能性がある。あるいは IgG の Fc 領域を接合することによって、A  
5 DCC 活性を有する IgM 分子を創出することもできる。

本発明において、可変領域をコードする遺伝子の由来は限定されない。たとえ  
ば、IgM 産生細胞から PCR 法によって可変領域遺伝子を増幅することができる。  
可変領域遺伝子を PCR 法によって増幅することができるプライマーは公知である  
(Ivanovzki et al., Blood (1998) 91: 2433-2442)。またファージ抗体ライプ  
10 ラリーから可変領域遺伝子を単離することもできる(Clackson et al., Nature  
(1991) 352:624-628; Marks et al., J. Mol. Biol. (1991) 222:581-597)。更に、  
IgG のような IgM 以外のイムノグロブリンの可変領域遺伝子を IgM の定常領域に  
接合することもできる。

可変領域遺伝子を取得するための IgM 産生細胞、あるいは IgM 以外のクラスの  
15 イムノグロブリン産生細胞としては、任意のイムノグロブリン産生細胞を利用する  
ことができる。たとえば、ヒトの末梢血から採取された B 細胞から、ヒト IgM  
あるいはヒト IgG などの可変領域遺伝子を取得することができる。具体的には、  
ヒト IgM あるいはヒト IgG を産生する B 細胞とミエローマ細胞との融合細胞の作  
製またはヒト IgM あるいはヒト IgG を産生する B 細胞を Epstein-Barr ウィルス  
20 で形質転換させることにより不死化させ、目的とする抗原に対する IgM を産生す  
る細胞をスクリーニングしてから可変領域遺伝子を取得するのが望ましい。また、  
目的とする抗原で免疫した免疫動物の B 細胞あるいは免疫担当細胞から、IgM あ  
るいは IgG などの可変領域遺伝子を取得することもできる。

更に IgM 産生細胞の mRNA から、IgM をコードする塩基配列の全長を取得する  
25 こともできる。まず予め構造の明らかにされている定常領域をコードする部分を  
PCR 法によって増幅する。次に 5' 方向の未知塩基配列を決定するための手法によ

って、可変領域をコードする部分を取得する。既知塩基配列情報に基づいて、未知塩基配列部分を増幅するための手法が公知である。たとえば 5'RACE によって、5' 側の未知塩基配列を取得することができる。

あるいは既にクローニングされた IgM 遺伝子が入手できる場合には、その遺伝子をそのまま、あるいは必要に応じて増幅して、以下のベクターあるいは遺伝子断片の構築に利用することもできる。

たとえば、ガングリオシド GM3 に対する IgM 抗体である L612 遺伝子の塩基配列が明らかにされている (Cancer Research 1993 ; 53 : 5244-5250)。またガングリオシド GM2 に対する IgM 抗体である L55 遺伝子の塩基配列が公知である (Immunogenetics 1998 ; 48 : 73-75)。

本発明に用いる IgM 遺伝子を改変して IgM 抗体変異体とすることができる。本発明において、「抗体変異体」とは、1 またはそれ以上のアミノ酸残基が改変された、抗体のアミノ酸配列バリエントを指す。どのように改変されたアミノ酸バリエントであれ、元となった抗体と同じ結合特異性を有すれば、本発明における「抗体変異体」に含まれる。このような変異体は、抗体の H 鎮若しくは J 鎮の可変ドメインのアミノ酸配列と少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、さらに好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、そして、最も好ましくは少なくとも 95% のアミノ酸配列相同性または類似性を有するアミノ酸配列と 100% よりも少ない配列相同性、または類似性を有する。

たとえば、IgM H 鎮に Cys 残基を導入された変異体において、5/6 量体の構造変換が確認されている (Davis, et. al. EMBO J. (1989) 8, 2519-2526)。あるいは、IgM H 鎮の 4 領域 ( $C\mu 1$ ,  $C\mu 2$ ,  $C\mu 3$ ,  $C\mu 4$ ) に欠失、変異を加えて、J 鎮の取り込みや 5/6 量体構造の変化が確認されている。これらの知見に基づいて、目的とする 5 量体あるいは 6 量体を構成しうる IgM の変異体をコードする遺伝子を得ることができる。

また、本発明の IgM 抗体は糖鎖が改変された IgM 抗体であってもよい。

一方、本発明における発現制御領域としては、たとえば、エンハンサーやプロモーターが利用される。この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、IgM を発現させることができる。

あるいは、これらの遺伝子を含む遺伝子断片によって宿主細胞を形質転換し、

5 本発明の形質転換細胞を得ることができる。たとえば、発現制御領域と構造遺伝子とからなる発現カセットを含む遺伝子断片は、宿主細胞のゲノムに相同組み換えによって導入することができる。遺伝子断片を保持した宿主細胞は、当該構造遺伝子を発現することができる。

本発明の形質転換細胞を得るには、適当な宿主細胞と発現ベクターまたは遺伝10 子断片の組み合わせを使用することができる。宿主細胞には、原核細胞や真核細胞が利用される。原核細胞としては、大腸菌や枯草菌などを利用することができる。一方真核細胞としては、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、あるいは酵母細胞等の細胞において、様々な外来性遺伝子の発現システムが実用化されている。

本発明の形質転換細胞を得るための望ましい宿主細胞として、哺乳動物細胞や15 昆虫細胞を示すことができる。既に述べたように、 $\mu$ 鎖はいくつかの糖鎖結合部位を有している。これらの糖鎖結合部位糖鎖を付加することによって、より天然の IgM に近い構造の IgM を得ることができる。天然の構造を模倣した  $\mu$ 鎖からなる IgM には、IgM としての高い活性が期待できる。IgM の活性とは、たとえば CDC 活性や多量体あるいは会合体の形成能を示すことができる。また、IgM の20 構造が天然の分子に近いことは、IgM の治療効果、および安全性の向上にも貢献する。天然の構造を有する IgM には、レシピエント (recipient) の免疫学的な排除機構が作用しにくいことが予測されるためである。

糖鎖を備えた状態で IgM を発現させるためには、真核細胞の利用が有利である。中でも哺乳動物細胞は、好ましい宿主細胞として示すことができる。より具体的25 には、非リンパ球系の哺乳動物細胞は、培養が容易であり、J鎖を発現していない細胞 (Cattaneo & Neuberger, EMBO J. (1987) 6:2753-2758, Davis et al.,

J. Exp. Med. (1988) 18:1001-1008) が多いため宿主細胞として好ましい。非リンパ球系細胞株として、CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞を示すことができる。これらの動物細胞においては、天然の IgM に近い糖鎖の付加を期待することができる。特に CHO 細胞は、高い IgM の発現レベルと、天然に近い糖鎖の付加が期待できるため、宿主細胞として好ましい。

本発明の形質転換細胞は、これらの宿主細胞に IgM の H鎖と L鎖、あるいは更に J鎖をコードする塩基配列 (IgM 遺伝子) を導入し発現させることによって得ることができる。これらの宿主細胞に外来性の遺伝子を導入し発現させるための発現ベクターが公知である。

10 本発明において、宿主細胞として真核細胞を用いる場合には、たとえば次のような宿主ベクター系を利用することができる。

たとえば哺乳動物由来の発現ベクターとして、pCXN (Niwa ら、Gene 1991;108: 193-200)、pcDNA3 (インビトロゲン社製)、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、および pCDM8 が公知である。動物ウィルス由来の発現ベクターによって哺乳動物細胞を形質転換することもできる。ウイルス由来の発現ベクターとして、pHSV、pMV、あるいは pAdexLcw を示すことができる。その他、レトロウィルス由来の発現ベクターである pZIPneo も、動物細胞の形質転換に有用である。

更に pBacPAK8 が、昆虫細胞用の発現ベクターとして市販されている (「Bac-to-BAC baculovirus expression system」、ギブコ BRL 社製)。また植物細胞用の発現ベクターとして、例えば pMH1 や pMH2 を示すことができる。更に酵母用の発現ベクターとして、例えば「Pichia Expression Kit」 (インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01 を示すことができる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、IgM 遺伝子が発現制御領域の制御下に発現できるように配置する。発現制御領域はエンハンサーやプロモーターを含む。たとえば哺乳動物細胞において有効なプロ

- 17 -

ロモーターとして、次のプロモーターを示すことができる。

アデノウイルス 2 型主後期プロモーター、

シミアンウイルス 40 初期プロモーター、

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター、

5 サイトメガロウイルスプロモーター、

ポリペプチド鎖伸長因子 1  $\alpha$  プロモーター (Mizushima ら, Nucleic Acids Re  
s. (1990) 18, 5322) 、

ウシ成長ホルモンプロモーター、

$\beta$  アクチン遺伝子プロモーター、および

10 CAG プロモーター

SV40 プロモーター (Mulligan ら, Nature (1979) 277, 108) 、

マウス乳癌ウイルス (MMTV)-LTR プロモーター、

これらのプロモーターの中で、好ましいプロモーターを以下に示す。これらの  
プロモーターは、哺乳動物細胞において高い発現誘導作用が期待できる。

15 シミアンウイルス 40 初期プロモーター、

サイトメガロウイルスプロモーター、

ポリペプチド鎖伸長因子 1  $\alpha$  プロモーター、

CAG プロモーター

更に選択マーカーを含む発現ベクターは、形質転換細胞の選択を容易にする。

20 選択マーカーとしては、ネオマイシンや G 418 に対する薬剤耐性遺伝子が一般  
に用いられる。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、  
pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、あるいは pOP13 などが挙げられる。

形質転換細胞において、導入された遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内  
での遺伝子のコピー数を増幅するための技術が公知である。たとえば、核酸合成

25 経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DHFR 遺伝子を有するベクターを導入  
すれば、メトトレキセート (MTX) により遺伝子の発現を増幅することができる。

DHFR 遺伝子には、としては pCHOI 等を示すことができる。

その他に、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて SV40 の複製起点を持つベクターで形質転換すれば、遺伝子の一過性の発現を得ることができる。SV40 の複製起点を持つベクターとしては、pcD 等が公知である。

5 複製開始点としては、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。

発現ベクターは、形質転換細胞における遺伝子コピー数増幅のために、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、  
10 ジビドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むこともできる。

真核細胞に加えて原核細胞の発現システムを本発明に利用することもできる。

例えば、大腸菌の発現ベクターとしては、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR 322、pBluescript、pCR-Script などが挙げられる。また枯草菌由来の発現ベクターとして、pPL608 や pKTH50 が挙げられる。宿主を JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL  
15 1-Blue などの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーターを利用する必要がある。このようなプロモーターとして、例えば、 lacZ プロモーター (Ward ら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、 araB プロモーター (Better ら, Science (1988) 240, 1041-1043 ) 、または T7 プロモーターなどを示すことができる。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX-5X-1 (ファルマシア社製) 、「QIAexpress system」 (キアゲン社製) 、pEGFP、または pET などが挙げられる。pET の場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば

塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

本発明は、上記ベクターまたは遺伝子断片が導入された形質転換細胞を提供する。上記ベクターを導入する宿主細胞は限定されない。例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることができる。本発明の形質転換細胞は、例えば、IgMの5 製造や発現のための產生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための產生系は、*in vitro*および*in vivo*の產生系がある。*in vitro*の產生系としては、真核細胞を使用する產生系や原核細胞を使用する產生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞株あるいはヒト細胞株としては、たとえば以下のよ10 うな哺乳動物細胞株が知られている。

CHO (hamster ovarian cell, J. Exp. Med. (1995) 108, 945) 、  
COS (monkey kidney cell, Miyazaki, et al., Gene (1989) 79, 269)、  
3T3 (mouse fibroblasts)、  
PC12 (human plasmacytoma, Neumann, et al., EMBO J.(1982) 1, 841)、  
15 BHK (baby hamster kidney) 、  
HeLa(human epithelial cell, Cattaneo, et al. EMBO J.(1987) 6, 2753)、  
C6 (human glioma cell, Cattaneo, et al. Eur. J. Biochem.(1983) 135, 285)、  
Vero、および  
アフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340) などの  
20 両生類細胞

この他、Sf9、Sf21、あるいはTn5等の昆虫細胞が知られている。

CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) 、あるいはCHO K-1 (Proc. N atl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) 等を好適に使用することができる。動物細胞25 において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。これらの細胞株は、寄託機関から入手することができる。以下に代表的な細胞株と、ATC

CのAccession Numberを記載した。

CHO	CCL-61, CRL-9096	BHK	CRL-1632
COS	CRL-1650, CRL-1651	HeLa	CCL-2
3T3	CRL-1658	Vero	CCL-81

5 発現ベクターは、任意の方法によって宿主細胞に導入することができる。ベクターの導入方法として、たとえば次のような方法を示すことができる。

リン酸カルシウム法、

DEAE デキストラン法、

カチオニックリボソーム DOTAP (ベーリンガーマンハイム社製) を用いた方法、

10 エレクトロポーレーション法、

リポフェクション

植物細胞としては、例えば、タバコ属 (*Nicotiana*) 由来の細胞がポリペプチド生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。また、近年、ウキクサ (*Lemnaceae*) やトウモロコシ (*Zea mays*) でのポリペプチド生産が報告されている。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces* 属、例えは、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 、糸状菌、例えは、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる生産系がある。細菌細胞としては、20 大腸菌 (*E. coli*) 、例えは、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

これらの宿主細胞を上記発現ベクターまたは遺伝子断片により形質転換すれば、IgM 産生能を有する形質転換細胞を得ることができる。これらの形質転換細胞から、高い IgM 産生能を有する細胞を選択することにより、本発明の形質転換細胞を得ることができる。

例えは形質転換細胞をクローニングし、各クローンの IgM 産生能を評価する。

IgM 産生能は、適当な培地で形質転換細胞を培養し、その培養上清中に含まれる IgM を測定することによって知ることができる。目的とする反応性を有する高力価の IgM を産生する細胞を選択するために、目的とする抗原を用いたイムノアッセイを利用することができる。たとえば、抗原を結合させたマイクロプレート 5 を利用する ELISA 法は抗原特異的な IgM の産生を確認する方法として好ましい。更に、IgM の細胞障害作用を評価するために、補体受容体の解析や IgM が有する CDC 作用を評価することもできる。IgM の測定方法や、細胞当たりの IgM の産生量を決定するための具体的な手法は、たとえば実施例(1. 6)に示したとおりである。

10 更に本発明は、5 量体または 6 量体の IgM を産生する形質転換細胞を提供する。本発明者らにより、宿主細胞を形質転換する発現ベクターまたは遺伝子断片に含まれる IgM 遺伝子が J 鎖をコードする塩基配列を有する場合には、IgM が 5 量体として発現されることが明らかにされた。また J 鎖をコードする塩基配列を含まない場合には、IgM は 6 量体として発現されることが明らかにされた。このよう 15 に、本発明の知見に基づいて、IgM の多量体構造を制御することが可能となった。

本発明において、J 鎖をコードする塩基配列は、H 鎖および L 鎖をコードする塩基配列を保持したベクターと同じベクター上に配置することができる。あるいは、J 鎖をコードする塩基配列を保持したベクターを、H 鎖および L 鎖をコードする塩基配列を保持したベクターとともに共形質転換 (コトランスフェクション; co-transfection) することによって細胞に導入することもできる。更に、H 鎖、L 鎖、および J 鎖をコードする塩基配列を、それぞれ別のベクターに配置して、同一の細胞にコトランスフェクションすることもできる。

单一のベクターに 3 つの遺伝子を配置して宿主細胞を形質転換することによつて、ベクター間の形質転換効率の違い、あるいは発現レベルの差を防ぐことができる。すなわち、H 鎖、L 鎖、および J 鎖の 3 つの遺伝子を配置された発現ベクターは、本発明の形質転換細胞を得るためのベクターとして好ましい。

- 22 -

すなわち本発明は、前記ベクターまたは遺伝子断片が、IgMのH鎖、IgMのL鎖、およびIgMのJ鎖をコードする塩基配列を有し、かつ60%以上の含量を持つ5量体IgMを产生する形質転換細胞に関する。本発明において、好ましい形質転換細胞は、80%以上の含量を持つ5量体IgMを产生する。产生されたIgM分子に占める5量体IgMの割合は、たとえば後に述べる方法（実施例4）によって知ることができる。本発明において、全IgM中の5量体と6量体の比（5量体/6量体比）は、たとえば1.5以上、好ましくは5以上、より好ましくは10以上である。

また本発明は、遺伝子断片またはベクターがIgMのH鎖およびL鎖をコードする塩基配列を有し、かつJ鎖をコードする塩基配列を有さず、50%以上の含量を持つ6量体IgMを产生する形質転換細胞に関する。本発明において、好ましい形質転換細胞は、80%以上の含量を持つ6量体IgMを产生する。产生されたIgM分子に占める6量体IgMの割合は、たとえば後に述べる方法（実施例4）によって知ることができる。本発明において、全IgM中の6量体と5量体の比（6量体/5量体比）は、たとえば1.5以上、好ましくは5以上、より好ましくは10以上である。6量体のIgMは5量体に比べてCDC活性が高いことが既に報告されている。したがって、6量体IgMを優先的に製造することができる本発明の方法は、抗体医薬の製造技術として有用である。

生体内に存在するIgMの主成分は、J鎖を介して構成された5量体である。5量体含有量が高い組換えIgMを生産することは、天然分子に近いIgMが得られることを意味し、有用である。また、J鎖を含むことにより、5量体以外の分子（1量体～4量体および6量体）がほとんど形成されないこと（Wiersma et al., J. Immunol. (1998) 160: 5979-5989、Sorensen et al., Int Immunol. (2000) 12:19-27）から、より純粋な組み換えIgMの生産が可能となる。

上記形質転換細胞を培養し、その培養物からIgMを取得することができる。形質転換細胞を、*in vitro*または*in vivo*で培養する方法が公知である。例えば

動物細胞は、適当な動物細胞培養用の培地で培養される。DMEM、MEM、RPMI1640、あるいはIMDM等の培地が、動物細胞培養用の培地として公知である。これらの培地には、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6～8が好ましい。培養は、通常、約30～45℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、あるいは攪拌を加える。

*in vitro*における培養方法として、培地中に細胞を分散させて培養する方法や、半透膜を介して細胞と培地を接触させる方法が公知である。*in vivo*での培養方法としては、マウスの腹腔内に細胞を接種する方法が知られている。

10 IgM発現ベクターで形質転換されたCHO細胞等の動物細胞は、培養上清中にIgMを分泌する。したがって、培養上清を回収することによって、目的とするIgMを得ることができる。培養上清は、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、あるいは各種のアフィニティクロマトグラフィーなどの精製技術を利用して、精製IgMとすることができる(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。本発明は、培養上清から精製された実質的に純粋なIgMの製造方法を提供する。本発明において、実質的に純粋なIgMとは、そのIgM分子が由来する生物種の蛋白質を含まないIgMと定義することができる。たとえば、ヒト由来のIgM遺伝子によって形質転換された細胞から回収されたIgM分子が、ヒト由来のIgM以外の蛋白質を含まないとき、このIgMは実質的に純粋なIgMと言うことができる。あるいは、マウス-ヒトキメラIgMであれば、マウスとヒトのいずれの蛋白質も含まないIgMは、実質的に純粋なIgMである。本発明における実質的に純粋なIgMは、宿主細胞由来の蛋白、および宿主細胞の培養に使用した培養液の蛋白成分を実質的に含まないことが望ましい。実質的に含まないとは、これらの蛋白質成分が総蛋白質に対して20%以下、たとえば10%以下、好ましくは5%以下、あるいは2%以下、更に好ましくは1%以下であることを言う。

これらの製造方法によって得ることができる IgM 抗体、あるいは実質的に純粹な IgM 抗体は本発明に含まれる。本発明における好ましい IgM 抗体は、5 0%以上の6量体、60%以上の5量体、好ましくは80%以上の5量体または6量体の IgM 分子からなる。本発明において、少なくとも50%以上の6量体 5 または60%以上の5量体で構成される IgM 抗体は、実質的に純粹な5量体あるいは6量体である。本発明において、より望ましい実質的に純粹な5量体あるいは6量体は、たとえば80%以上の含量を有する。このような実質的に純粹な IgM は、医薬用組成物として有用である。

本発明における IgM 抗体が由来する種は限定されない。本発明によって、たとえば、ヒト抗体、あるいはマウス抗体を得ることができる。また本発明の IgM 抗体は、先に述べたように、定常領域と可変領域の遺伝子の由来が異なるキメラ抗体とすることもできる。キメラ抗体として、ヒト（定常）－ヒト（可変）キメラ抗体、あるいはヒト（定常）－異種動物（可変）キメラ抗体を示すことができる。ヒト－ヒトキメラ抗体をコードする遺伝子は、予めクローニングされたヒト定常 15 領域遺伝子に、任意の可変領域遺伝子を接合して得ることができる。更に本発明は、ヒト化抗体を含む。ヒト化抗体は、ヒト可変領域遺伝子のフレームワークに、異種動物由来の CDR を組み込んだ遺伝子を発現させることによって得ることができる。

本発明の IgM 抗体が認識する抗原は限定されない。IgM 抗体は、CDC 活性を備えた細胞障害性の強い抗体である。さらに、細胞死誘導活性を持つ IgM 抗体も報告されている (Yonehara et al., J. Exp. Med. (1989) 169:1747-1756)。したがって、IgM 抗体は、癌の治療のような細胞障害を治療戦略とする医療技術に有用である。たとえば、様々な糖鎖抗原が腫瘍細胞の細胞表面マーカーとして利用できることが知られている。そのため糖鎖を認識する IgM 抗体は、細胞を標的とする抗体医薬として有用である。たとえば、ある種のガングリオシドは腫瘍細胞に対する抗体医薬の標的分子として有用なことが知られている。具体的には、ガン

グリオシド GM2、GD2、GD3、あるいは GM3 に対する抗体の、いくつかの腫瘍細胞に対する障害作用が確認されている。ガングリオシド GM2 あるいはガングリオシド GM3 に対する IgM 抗体は、本発明における好ましい IgM として示すことができる。これらの IgM 抗体を本発明の方法によって製造することもできる。

5 ガングリオシド GM2 あるいは GM3 を認識するいくつかの抗体が報告されている。本発明における抗ガングリオシド GM2 IgM 抗体、あるいは抗ガングリオシド GM3 IgM 抗体の由来は限定されない。既知の IgM 抗体の遺伝子を利用することもできるし、新たな抗 IgM 抗体遺伝子を取得して、本発明に応用することもできる。たとえば、以下の配列番号に記載のアミノ酸配列は、本発明における好ましい抗 10 ガングリオシド GM2 抗体、および抗ガングリオシド GM3 抗体の可変領域として示すことができる。これらのアミノ酸配列をコードする DNA の塩基配列を () 内に記載した。

抗ガングリオシド GM2 抗体 (L55) :

H鎖 : 配列番号 : 20 (配列番号 : 19)

15 L鎖 : 配列番号 : 22 (配列番号 : 21)

抗ガングリオシド GM3 抗体 (L612) :

H鎖 : 配列番号 : 2 (配列番号 : 1)

L鎖 : 配列番号 : 4 (配列番号 : 3)

更に本発明は、上記の IgM 抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。特に本発明は、5 量体あるいは 6 量体のいずれかを他方に比べて多く含む IgM を提供した。その結果、本発明によって、IgM の 5 量体あるいは 6 量体に富む医薬組成物が提供された。すなわち本発明は、5 量体 / 6 量体比が、たとえば 1. 5 以上、好ましくは 5 以上、より好ましくは 10 以上である医薬組成物を提供する。あるいは本発明は、6 量体 / 5 量体比が、たとえば 1. 5 以上、好ましくは 5 以上、より好ましくは 10 以上である医薬組成物を提供する。たとえば、本発明の抗ガングリオシド GM2 IgM 抗体または抗ガングリオシド G

M3 IgM 抗体を有効成分として含有する薬剤を投与することにより、癌の治療 (または癌の予防) を行うことができる。さらに抗ガングリオシド GM2 IgM 抗体を有効成分として含有する薬剤を投与することにより、エイズの治療 (またはエイズの予防) を行うこともできる。本発明は、このような治療方法 (または予防方法) もまた提供する。

抗ガングリオシド GM2 IgM 抗体または抗ガングリオシド GM3 IgM 抗体を有効成分として含有する薬剤は、任意の方法によって投与することができる。したがって、経口、非経口投与のいずれでも可能である。好ましい投与方法は、非経口投与である。非経口投与のための具体的な剤型として、注射剤型、経鼻投与剤型、  
10 経肺投与剤型、経皮投与型などを示すことができる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。さらに癌の疾患局所に直接投与することもできる。  
- 抗ガングリオシド GM2 IgM 抗体または抗ガングリオシド GM3 IgM 抗体を有効成分として含有する薬剤自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法に  
15 より製剤化した薬剤として投与することもできる。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で使用できる。また、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、ベヒクル、防腐剤などと  
適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和  
20 することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように調節することができる。

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが利用される。補助剤には、具体的には、例えば D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等を利用することができる。医薬組成物には、適当な溶解補助剤を加える

こともできる。例えばアルコールや非イオン性界面活性剤は、溶解助剤として好ましい。アルコールとしては、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を示すことができる。また非イオン性界面活性剤としては、例えばポリソルベート 80<sup>TM</sup>、あるいは HCO-50 を

5 用いることができる。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された  
10 注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

また、患者の年齢、症状により適宜投与量を選択することができる。例えば、一回につき体重 1kg あたり 0.0001mg から 1000mg の範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり 0.001～100000mg/body の範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の治療薬はこれらの投与量に制限されるもの  
15 ではない。

細胞膜に付着、あるいは細胞内に取り込まれた IgM 抗体は、補体の存在下で、または IgM 単独で細胞障害作用を有する。本発明の IgM 抗体を利用した抗体医薬製剤において、抗体には各種の治療用成分を結合してその治療効果を更に高めることもできる。治療用成分としては、ドキソルビシン、メトトレキセート、タキソールなどの化学療法剤、重金属、放射核種、Pseudomonas 解毒素などのトキシン類を挙げることができる。治療用成分との結合体を生産する方法および治療に使用する方法については、米国特許 5057313 号、米国特許 5156840 号に記載されている。あるいは、本発明によって得られた IgM 抗体を、化学療法剤あるいは同種抗原、他種抗原を認識する抗体製剤と併用することによって、治療効果を高め  
20 ることもできる。

更に本発明は、次の a)～c) からなる群から選択された少なくとも 1 つの条件を

満たすポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって IgM を分離する工程を含む、 IgM の多量体を分析する方法を提供する。

- a) 高温で重合させたポリアクリルアミドゲル、
- b) 高濃度の過硫酸アンモニウムを含有するポリアクリルアミドゲル、および
- 5 c) 重合させる前に攪拌、脱泡により均一化したポリアクリルアミドゲル。

IgM は分子量 100 万程度と非常に高分子量であるため、一般的な方法では多量体構造（5 量体と 6 量体）を定量的に解析することは困難である。報告されている IgM の多量体構造の分析法においては、 RI 標識した IgM を用いて非還元 SDS-PAGE を行なっている（文献 6 / J. Immunol. (1994) 152;1206）。この方法には、  
10 RI が必要である。一方、 IgM を医薬品として開発するためには、製造過程において IgM の多量体構造を分析することができる技術が必要である。具体的には、製造細胞の選定、細胞培養のモニタリング、精製、原体製造、製剤製造のあらゆる工程において IgM の多量体構造の分析が必要である。これらの工程における IgM の解析には、 RI を必要としない解析方法が求められる。本発明者らは、上記の  
15 ような条件を利用することによって、 IgM の多量体構造を解析しうることを見出し、本発明を完成した。以下に各条件について具体的に述べる。

- a) 高温で重合させたポリアクリルアミドゲル：

通常、イムノグロブリンなどの蛋白質の電気泳動に利用されるポリアクリルアミドゲルの重合温度は、室温である。これに対して、たとえば 37°C 以上、好ましくは 40°C ~ 60°C で重合させたポリアクリルアミドゲルは、本発明の IgM の解析方法に有用である。このような高温条件を与えることにより、アクリルアミドを迅速に重合させることができる。

- b) 高濃度の過硫酸アンモニウム (Ammonium PerSulfate;APS) を含有するポリアクリルアミドゲル：

一般に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用のポリアクリルアミドゲルは、  
25 0.05% 程度の APS を含んでいる。これに対して、たとえば 0.25% 以上、好

ましくは0.1%～0.5%のAPSを含むポリアクリルアミドゲルは、本発明のIgMの解析方法に有用である。

c)重合させる前に攪拌、脱泡により均一化したポリアクリルアミドゲル：

電気泳動分析用のポリアクリルアミドゲルは、気泡を生じないように均一に調製することが重要である。そのため、ポリアクリルアミドゲルの重合開始剤を添加後、気泡が混入しないように注意しながら重合溶液を十分に攪拌する。これに對して本発明では、HYBRID MIXER(KEYENCE)を用いて、より完全に重合溶液を均一に攪拌し、かつ、気泡の混入を防ぐために脱泡を行い、均一なゲルを作製した。

本発明のIgM解析方法は、上記条件a)-c)のうち、少なくともいずれか一つの条件を満たすポリアクリルアミドゲルを用いることによって実施することができる。IgMを、その多量体構造を維持したまま高い精度で解析するためには、好ましくは上記条件a)-c)のうちの少なくとも2つ以上、より好ましくはa)-c)の全ての条件を満たすポリアクリルアミドゲルを用いることができる。

本発明によるIgMの解析において、電気泳動用の緩衝液は任意の緩衝液を利用することができる。たとえばTris-acetate SDS泳動バッファーは、本発明のIgMの解析方法において好ましい緩衝液である。Tris-acetate SDS泳動バッファーの具体的な組成は、後に述べる実施例に記載されたとおりである。

本発明のIgMの解析方法は、5量体および/または6量体のIgMを解析対象とすることができます。本発明におけるIgMの解析とは、IgM分子が5量体構造を有しているのか、あるいは6量体構造を有しているのかを明らかにすることを言う。5量体とは、2分子のH鎖と2分子のL鎖からなるIgMの構成単位を5つ有するIgMを言う。同様に6量体は、構成単位が6であるIgMを指す。

IgM分子の5量体構造、あるいは6量体構造とは、公知の方法（文献6/J. Immunol. (1994) 152;1206）によって確認することができる5量体構造、あるいは6量体構造を言う。更に本発明のIgMの解析方法によれば、5量体または6量体として存在するIgMの量比を明らかにすることもできる。例えば、電気泳動後のゲ

ル中の IgM を直接あるいは膜に転写して可視色素あるいは蛍光色素等で染色できる。更に、染色強度あるいは蛍光強度を測定して目的の IgM 構造体を定量することができる。本発明に基く IgM の 5 量体あるいは 6 量体の定量方法は、具体的には実施例 3 および実施例 4 に記載したような方法に基いて実施することができる。

5 その他、超遠心分離を利用した公知の方法によって、IgM の 5 量体および 6 量体の量比を推定することもできる。

本発明の IgM の多量体の分析方法は、IgM の会合体の分析に利用することができる。本発明において、複数の IgM 分子が共有結合によって結合した分子を会合体と言う。会合体の形成によって IgM の抗体としての活性は変化する。たとえば、  
10 分子が巨大化しているため、IgM の会合体は沈殿を生じやすい。したがって医薬品として IgM を開発するためには、IgM の会合体の定量的評価が必要である。本発明の IgM の多量体の分析方法は、IgM の 5 量体と 6 量体の量比のみならず、IgM の会合体の量比の定量的な評価も可能である。

より具体的には、上記条件で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施し、  
15 5 量体（または 6 量体）に相当する分子量を有する位置に蛋白質が泳動され、かつ抗 IgM 抗体がその蛋白に結合されれば、IgM が 5 量体（または 6 量体）として存在していることを明らかにすることができます。蛋白質が精製された IgM であれば、蛋白質染色によって泳動位置を知ることができます。あるいは未精製の IgM であっても、抗  $\mu$  鎮抗体を使ったイムノプロット解析によって IgM のバンドを同  
20 定することができる。同定された IgM のバンドの強度を定量的に、あるいは半定量的に評価すれば、IgM の量を決定することができる。電気泳動像から蛋白質の量を決定する方法は公知である。

本発明の IgM の分析方法を利用すれば、IgM の多量体構造を明瞭に識別することができる。したがって、電気泳動後の IgM は、放射性同位元素 (RI) を使用しないで検出することができる。本発明において、RI を使用しない分析方法 (non-isotopic analysis) とは、電気泳動後の IgM を放射性同位元素以外の手段によって

検出する工程を含む分析方法を言う。放射性同位元素以外の手段としては、たとえば蛋白質の染色、あるいは IgM に結合する親和性物質による検出を示すことができる。親和性物質としては、抗 IgM 抗体、プロテイン L、プロテイン A、プロテイン G、IgM Fc レセプターなどを用いることができる。本発明の分析方法において、これらの親和性物質は予め標識しておくことができる。親和性物質の標識には、酵素、あるいは色素を用いることができる。酵素としては、ペーオキシダーゼ(POD)、 $\beta$  ガラクトシダーゼ( $\beta$ -GAL)、あるいはアルカリ性 fosfataze(ALP)などが用いられる。色素には、蛍光色素、発光色素、あるいは発色色素などが含まれる。これらの標識は、いずれも非放射性物質である。

また本発明は、次の a) -c) からなる群から選択された少なくとも 1 つの条件を満たすポリアクリルアミドゲルからなる、IgM の多量体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離するための電気泳動用ゲルに関する。あるいは本発明は、次の a)-c) からなる群から選択された少なくとも 1 つの条件を満たすポリアクリルアミドゲルの、IgM の多量体を分析する方法における使用に関する。

- 15 a) 高温で重合させたポリアクリルアミドゲル、
- b) 高濃度の APS (Ammonium PerSulfate) を含有するポリアクリルアミドゲル、および
- c) 重合させる前に攪拌、脱泡により均一化したポリアクリルアミドゲル。

これらのポリアクリルアミドゲルは、いずれも本発明の IgM 解析方法に有用である。上記の条件 a)-c) の少なくとも一つを満たすポリアクリルアミドゲルが、IgM の解析に有用であることは本発明によって始めて明らかにされた。本発明における好ましいポリアクリルアミドゲルは、上記条件の a) -c) の 2 つ以上、より好ましくは a) -c) の全ての条件を満たす。更に本発明は、次の a)-c) からなる群から選択された少なくとも 1 つの工程を含む、IgM の多量体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離するための電気泳動用ゲルの製造方法に関する。

- 3 2 -

- a) アクリルアミドを高温で重合させる工程、
- b) アクリルアミドに高濃度の過硫酸アンモニウムを添加する工程、および
- c) 重合させる前にアクリルアミドを攪拌、および脱泡により均一化する工程。

本発明における好ましいポリアクリルアミドゲルの製造方法は、上記工程の

5 a) -c) の2つ以上、より好ましくは a) -c) の全ての工程を含む。すなわち本発明は、次の工程 a)-c) を含む、IgM の多量体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離するための電気泳動用ゲルの製造方法を提供する。

- 1) アクリルアミドに高濃度の過硫酸アンモニウムを添加する工程、
- 2) 重合させる前にアクリルアミドを攪拌、および脱泡により均一化する工程、

10 および

- 3) アクリルアミドを高温で重合させる工程。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 15 図面の簡単な説明

図 1 は、組換え型 L612 の培養上清のウエスタンプロッティングの結果を示す写真である。左 (J鎖+) は J鎖発現形質転換細胞の、右 (J鎖-) は J鎖遺伝子を導入していない形質転換細胞の培養上清の解析結果を示す。各レーンはそれぞれ次の試料の結果に対応している。

20 marker: 分子量マーカー

bulk: L612 精製品

左の写真 (J鎖+) の CJ15、CJ25、CJ38、CJ45、および CJ67 は、それぞれ実施例 1.5 で得た L612 安定発現細胞株の培養上清の結果を示す。

右の写真 (J鎖-) の CA02、CA15、CA19、CA20、および CA24 は、それぞれ実施例 1.5 で得た L612 安定発現細胞株の培養上清の結果を示す。

図 2 は、組換え型 L55 の培養上清のウエスタンプロッティングの結果を示す写

真である。左（J鎖+）はJ鎖遺伝子を導入していない形質転換細胞の、右（J鎖-）はJ鎖発現形質転換細胞の培養上清の解析結果を示す。各レーンはそれぞれ次の試料の結果に対応している。

St: L55 精製品

5 左の写真（J鎖+）の05、23、32、49、および61は、それぞれ実施例2.3で得たL55安定発現細胞株LJ05、LJ23、LJ32、LJ49、およびLJ61の培養上清の結果を示す。

右の写真（J鎖-）の24、26、39、66、および74は、それぞれ実施例2.4で得たL55安定発現細胞株LA24、LA26、LA39、LA66、およびLA74の培養上清の結果を示す。

図3は、組換え型L612の培養上清中の各多量体を検出した結果を示す写真である。各レーンはそれぞれ次の試料の結果に対応している。

L612: L612精製品の結果を示す。

CA19: 実施例1.5で得たL612安定発現細胞株CA19の培養上清の結果を示す。

15 CJ45: 実施例1.5で得たL612安定発現細胞株CJ45の培養上清の結果を示す。

図4は、pL612pentaCA4導入株における多量体形成を解析した結果を示す写真である。

図5は、組換え型L612の細胞障害活性を測定した結果を示す図である。上図は、補体原として全血を加えた場合を示し、下図はヒト由来血漿100%を加えた場合を示す。縦軸は標的細胞から特異的に放出された<sup>51</sup>Cの割合（%）を示す。横軸は抗体の濃度（μg/mL）を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

25 [実施例1] ガングリオシドGM3に対する組換え型ヒト抗体L612の作製

1.1 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の構築

- 3 4 -

ガングリオシド GM3 に結合するヒト抗体（以下、L612 と表記する）の H鎖をコードする遺伝子は、Epstein-Barr ウィルスで形質転換されたヒト B 細胞（以下、L612 発現 B 細胞と表記する）より抽出した Total RNA を用いて、RT-PCR 法によって増幅した。L612 の H鎖可変領域遺伝子の塩基配列については、Hoon ら 5 により報告されている（Cancer Research 1993 ; 53 : 5244-5250）。

Total RNA は、RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN 社製) を用いて  $1 \times 10^7$  細胞の L612 発現 B 細胞より抽出した。IgM H鎖定常領域の塩基配列に基づいて 2 本のオリゴヌクレオチド (LMH-f3, LMH-r3) を設計した。LMH-f3 (配列番号 : 7) はセンス方向で、LMH-r3 (配列番号 : 8) はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。 10

1  $\mu$ g の Total RNA を使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い 5' 末端側と 3' 末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5' 末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド LMH-r3 を用い、3' 末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド LMH-f3 を用いた。逆転写反応は 42°C で 1 時間 30 15 分間反応させた。

PCR 反応溶液 (50  $\mu$  L) の組成を次に示す。

5  $\mu$  L の 10×Advantage 2 PCR Buffer、

5  $\mu$  L の 10×Universal Primer A Mix、

0. 2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

20 1  $\mu$  L の Advantage 2 Polymerase Mix、

(以上の成分はいずれも CLONTECH 社製)

2. 5  $\mu$  L の逆転写反応産物、

10 pmole の合成オリゴヌクレオチド LMH-f3 または LMH-r3

また反応温度条件は次のとおりである。

25 94°C の初期温度にて 30 秒間、

94°C/5 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回

- 35 -

94°C/5 秒間、70°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復

94°C/5 秒間、68°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 25 回反復

最後に反応産物を 72°C で 7 分間加熱した。

PCR 産物は QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、アガロー

5 スゲルから精製した後、pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) ヘクローニングした。塩基配列決定の後、5' 末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素 ApaI (宝酒造社製) 及び SacII (宝酒造社製) で消化して得られる約 1.1 kbp の断片、および 10 3' 末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素 ApaI (宝酒造社製) 及び NotI (宝酒造社製) で消化して得られる約 1.1 kbp の断片を混合し、pBluescript KS+ ベクター (東洋紡社製) ヘクローニングし、完全長 L612H 鎖遺伝子を得た。

動物細胞発現用ベクターへクローニングするために、合成オリゴヌクレオチド LMH-fxho、LMH-rsal を用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LMH-fxho (配列番号：1 1) は前方プライマーで L612H 鎖遺伝子の 5' 末端にハイブリダイズし、かつ XhoI 制限酵素認識配列ならびにコザック配列 (Kozak, M. J. Mol. Biol. (19 87) 196, 947) を持つように、また LMH-rsal (配列番号：1 2) は後方プライマーで L612H 鎖遺伝子の 3' 末端にハイブリダイズし、SalI 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR 反応溶液 (50 μL) の組成を次に示す。

5 μL の 10×PCR Buffer、

20 1 mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

1 ユニットの DNA ポリメラーゼ KOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製) 、

10 ng の完全長 L612H 鎖遺伝子を含む pBluescript KS+ ベクター、

25 10 pmole の合成オリゴヌクレオチド LMH-fxho、LMH-rsal

また反応温度条件は次のとおりである。

- 3 6 -

94°Cの初期温度にて 2 分間、

94°C/15 秒間、60°C/30 秒間、68°C/2 分間のサイクルを 30 回反復

最後に反応産物を 72°C で 5 分間加熱した。

増幅した遺伝子断片は、制限酵素 *Xho*I (宝酒造社製) および制限酵素 *Sal*I

5 (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、pUCAG の制限酵素 *Xho*I 部位に連結し、クローニングした。

本ベクター pUCAG は、pCXN (Niwa ら、Gene 1991 ; 108 : 193-200) を制限酵素 *Bam*HI で消化して得られる 2.6 kbp の断片を pUC19 ベクター (東洋紡社製) の制限酵素 *Bam*HI 部位に連結し、クローニングしたベクターである。完成したプラスミドを pUCAG/L612H と命名した。本プラスミドに含まれる L612H 鎖の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号 : 1 及び配列番号 : 2 に示す。

### 1.2 抗ガングリオシド GM3 ヒト抗体 L 鎖遺伝子の構築

L612 の L 鎖をコードする遺伝子は L612 発現 B 細胞より抽出した Total RNA を用いて、RT-PCR 法によって増幅した。L612 の L 鎖可変領域遺伝子の塩基配列については、Hoon らにより報告されている (Cancer Research 1993 ; 53 : 5244-5250)。

Total RNA は、実施例 1.1 と同様にして L612 発現 B 細胞より抽出した。IgM L 鎖定常領域の塩基配列に基づいて、2 本のオリゴヌクレオチド (LML-f1, LML-r 1) を設計した。LML-f1 (配列番号 : 9) はセンス方向で、LML-r1 (配列番号 : 10) はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。1 μg の Total RNA を使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い 5' 末端側と 3' 末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5' 末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド LML-r1 を用い、3' 末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド LML-f1 を用いた。逆転写反応は 42°C で 1 時間 30 分間反応させた。

25 PCR 反応溶液 (50 μL) の組成を次に示す。

5 μL の 10×Advantage 2 PCR Buffer、

- 37 -

5  $\mu$  L の 10×Universal Primer A Mix、  
0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、  
1  $\mu$  L の Advantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれも CLONTECH 社製)

5 2. 5  $\mu$  L の逆転写反応産物、  
10pmole の合成オリゴヌクレオチド LML-f1 または LML-r1  
また反応温度条件は次のとおりである。  
94°C の初期温度にて 30 秒間、  
94°C/5 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復  
10 94°C/5 秒間、70°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復、  
94°C/5 秒間、68°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 25 回反復  
最後に反応産物を 72°C で 7 分間加熱した。  
PCR 産物は QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) へクローニング  
15 した。塩基配列決定の後、5' 末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で消化して得られる約 0.7 kbp の断片、および 3' 末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で消化して得られる約 0.9 kbp の断片を混合し、合成オリゴヌクレオチド LML-feco、LML-rnot を用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LML-feco (配列番号：13) は前方プライマーで L612L 鎮遺伝子の 5' 末端にハイブリダイズし、かつ EcoRI 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また LML-rnot (配列番号：14) は後方プライマーで L612L 鎮遺伝子の 3' 末端にハイブリダイズし、NotI 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。  
20 PCR 反応溶液 (50  $\mu$  L) の組成を次に示す。  
25 5  $\mu$  L の 10×PCR Buffer、  
1mM MgSO<sub>4</sub>、

- 38 -

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

1 ユニットの DNA ポリメラーゼ KOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)

5' 末端側遺伝子断片、

5 3' 末端側遺伝子断片、

10pmole の合成オリゴヌクレオチド LML-feco、LML-rnot

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて 2 分間

94°C/15 秒間、60°C/30 秒間、68°C/2 分間のサイクルを 30 回反復

10 最後に反応産物を 72°C で 5 分間加熱した。

增幅した遺伝子断片は、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 NotI (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、pCXND3 の制限酵素 EcoRI および NotI 切断部位に連結し、クローニングした。

15 本ベクター pCXND3 の構築の流れについて、以下に述べる。DHFR-ΔE-rvH-PM1-f (W092/19759 参照) の抗体 H鎖遺伝子とベクターを分割するために、制限酵素 EcoRI/SmaI 部位で消化し、ベクター側のみ回収した後に、EcoRI-NotI-BamHI adaptor (宝酒造社製) をクローニングした。このベクターを pCHOI と命名した。

pCHOI の DHFR 遺伝子発現部位を pCXN (Niwa ら、Gene 1991 ; 108 : 193-200)

20 の制限酵素 HindIII 部位にクローニングしたベクターを pCXND3 と命名した。また、L鎖遺伝子断片を pCXND3 にクローニングし、完成したプラスミドを pCXND3/L612L と命名した。本プラスミドに含まれる L612L 鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号 : 3 および配列番号 : 4 に示す。

### 1.3 抗ガングリオシド GM3 ヒト抗体の発現ベクターの構築

25 L612 発現ベクターを作製するために、pUCAG/L612H を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で消化して得られる約 4.0 kbp の断片を pCXND3/L612L の制限酵素 HindI

- 3 9 -

II 切断部位に連結し、クローニングした。完成したプラスミドを pCXND3/L612IgM と命名した。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR 遺伝子、および L612 遺伝子を発現する。

#### 1.4 抗ガングリオシド GM3 ヒト抗体 J鎖遺伝子および発現ベクターの構築

5 L612 の J鎖をコードする遺伝子は L612 発現 B 細胞より抽出した Total RNA を用いて、RT-PCR 法によって増幅した。Total RNA は、上記と同様にして L612 発現 B 細胞より抽出した。GenBank に登録されているヒト抗体 J鎖遺伝子の塩基配列 (GenBank 番号 : M12759) に基づいて、2 本のオリゴヌクレオチド (J-f1, J-r1) を設計し、合成した。J-f1 (配列番号 : 15) はセンス方向でヒト抗体 J鎖遺伝子 Exon3 にハイブリダイズし、J-r1 (配列番号 : 16) はアンチセンス方向でヒト抗体 J鎖遺伝子 Exon4 にハイブリダイズする。

10

15 1  $\mu$ g の Total RNA を使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い 5' 末端側と 3' 末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5' 末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド J-r1 を用い、3' 末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド J-f1 を用いた。逆転写反応は 42°C で 1 時間 30 分間反応させた。

PCR 反応溶液 (50  $\mu$ L) の組成を次に示す。

20 5  $\mu$ L の 10×Advantage 2 PCR Buffer、

5  $\mu$ L の 10×Universal Primer A Mix、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

1  $\mu$ L の Advantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれも CLONTECH 社製)

25 2. 5  $\mu$ L の逆転写反応産物、

10pmole の合成オリゴヌクレオチド J-f1 または J-r1

また反応温度条件は次のとおりである。

94°C の初期温度にて 30 秒間

- 4 0 -

94°C/5秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復

94°C/5秒間、70°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復

94°C/5秒間、68°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを25回反復

最後に反応産物を72°Cで7分間加熱した。

5 PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。

塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で消化して得られる約0.5kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で消化して得られる約1.0kbpの断片を混合し合成オリゴヌクレオチドJ-feco、J-rxbaを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。

J-feco (配列番号: 17) は前方プライマーでL612J鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつEcoRI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つよう15に、またJ-rxba (配列番号: 18) は後方プライマーでL612J鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、XbaI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR反応溶液(50μL)の組成を次に示す。

5μLの10×PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>、

20 0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)

5'末端側遺伝子断片、

3'末端側遺伝子断片、

25 10pmoleの合成オリゴヌクレオチドJ-feco、J-rxba

また反応温度条件は次のとおりである。

- 41 -

94°Cの初期温度にて 2 分間

94°C/15 秒間、60°C/30 秒間、68°C/2 分間のサイクルを 30 回反復

最後に反応産物を 72°C で 5 分間加熱した。

増幅した遺伝子断片は、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 XbaI

5 (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社  
製) を用いて精製し、pCOSII-Zeo の制限酵素 EcoRI および XbaI 切断部位に連結  
し、クローニングした。

本ベクター pCOSII-Zeo は、上述の pCHOI の DHFR 遺伝子発現部位を除去し、Ze  
ocin 耐性遺伝子発現部位をクローニングしたベクターである。完成したプラス  
10 ミドを pCOSII-Zeo/J chain と命名した。本プラスミドに含まれる L612J 鎖の塩  
基配列及びアミノ酸配列を配列番号：5 および配列番号：6 に示す。

### 1.5 動物細胞を用いた抗ガングリオシド GM3 ヒト抗体の発現

CHO 細胞 (DG44 株) を用いた安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。  
Gene PulserII (BioRad 社製) を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子  
15 導入した。

J 鎖を発現しない細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。L612 発現ベクタ  
ー pCXND3/L612IgM (25  $\mu$ g) と PBS に懸濁した CHO 細胞 ( $1 \times 10^7$  細胞/ml) の 0.7  
5ml を混合したものを氷上で 10 分間冷却し、キュベットに移した後に 1.5kV、25  
 $\mu$ FD の容量にてパルスを与えた。

20 室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、  
HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含む CHO-S-SFMII 培地 (Invitro  
gen 社製) 40mL に懸濁した。同様の培地で 50 倍希釈溶液を作製し、96 ウェル  
培養用プレートに 100  $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) で  
24 時間培養後、Geneticin (Invitrogen 社製) を 0.5mg/mL になるように添加し  
25 て 2 週間培養した。

Geneticin 耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清

- 42 -

中の IgM 量について実施例 1.6 に示す濃度定量法で測定した。L612 高発現細胞株を順次拡大培養し、L612 安定発現細胞株 CA02、CA15、CA19、CA20、および CA24 を得た。

また、J鎖を発現する細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。L612 発現ベクター pCXND3/L612IgM (25  $\mu$ g) および J鎖発現ベクター pCOSII-Zeo/J chain (20  $\mu$ g) と PBS に懸濁した CHO 細胞 ( $1 \times 10^7$  細胞/ml) の 0.75ml を混合したもの

5 を氷上で 10 分間冷却し、キュベットに移した後に 1.5kV、25  $\mu$ FD の容量にてパルスを与えた。

室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、

10 HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含む CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) 40mL に懸濁した。

同様の培地で 50 倍希釈溶液を作製し、96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーター (5%CO<sub>2</sub>) で 24 時間培養後、0.5mg/mL 濃度の Geneticin (Invitrogen 社製) および 0.6mg/mL 濃度の Zeocin (Invitrogen 社製) を添加して 2 週間培養した。Geneticin、Zeocin 耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中の IgM 量について実施例 1.6 に示す濃度定量法で測定した。L612 高発現細胞株を順次拡大培養し、L612 安定発現細胞株 (CJ15、CJ25、CJ38、CJ45、CJ67) を得た。

### 1.6 培養上清中の IgM 濃度の測定

20 培養上清中の IgM 濃度の測定は以下のように行った。Anti-Human IgM (BIOSOR CE 社製) を 1  $\mu$ g/ml になるように Coating Buffer (0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.02%NaN<sub>3</sub>) で希釈し、96 ウェル ELISA 用プレートに 100  $\mu$ l/ウェルで加え、4°C で 24 時間以上反応させ、コーティングを行った。

さらに、Rinse Buffer で洗浄した後に、200  $\mu$ L/ウェルの Diluent Buffer を

25 加え、室温で 1 時間以上反応させ、ブロッキングした。Rinse Buffer および Diluent Buffer の組成はそれぞれ次のとおりである。

- 4 3 -

Rinse Buffer:

PBS(-)、  
0.05% Tween20

Diluent Buffer:

5 50mM Tris、  
1mM MgCl<sub>2</sub>、  
0.15M NaCl、  
0.05% Tween20、  
0.02% NaN<sub>3</sub>、  
10 1% BSA

その後、Diluent Buffer で適当に希釈した培養上清を 100 μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。Rinse Buffer で洗浄した後に、Goat Anti-Human IgM、Alkaline Phosphatase conjugated (BIOSOURCE 社製) を Diluent Buffer で 4000 倍に希釈し、100 μL/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。最後に Rinse Buffer で洗浄した後にアルカリリフォスファターゼ基質 (SIGMA 社製) を加え、吸光度計 Benchmark Plus (BioRad 社製) を用いて、測定波長 405nm、対照波長 655 nm の吸光度を測定した。IgM 濃度は L612 精製品 (Hoon ら、Cancer Research 1993 ; 53 : 5244-5250) との比較で算出した。

各種 L612 安定発現細胞株を 75cm<sup>2</sup> 培養フラスコ内で初発細胞密度 2x10<sup>5</sup> cells/mL で培養し、培養上清中の IgM 濃度を上記の方法で測定した。結果を表 1 に示す。IgM 産生量は培養 3 日目で約 20mg/L、培養 7 日目で約 50mg/L であり、単一細胞が産生する能力を示す産生能は 5~19pg/cell/day であった。IgM はイムノグロブリンの中でも多量体を形成するために、組換え体は発現量が低く、大量に調製することが困難であるとされていたが、今回の結果より、CHO 細胞において高い産生量の組換え型 IgM 発現細胞が作製できることが明らかになった。

表 1

J鎖発現	細胞株	培養3日間の産生量 (mg/L)	培養7日間の産生量 (mg/L)	産生能 (pg/cell/day)
無し	CA02	24.1	36.9	14.1
	CA15	11.8	39.7	4.9
	CA19	27.1	62.3	13.1
	CA20	20.2	35.4	10.5
	CA24	25.0	41.5	10.7
有り	CJ15	29.4	N. T.	19.4
	CJ25	24.4	N. T.	18.1
	CJ38	14.9	N. T.	12.4
	CJ45	26.4	N. T.	18.7
	CJ67	18.0	N. T.	12.8

N.T.:Not Tested

## 〔実施例2〕 ガングリオシドGM2に対する組換え型ヒト抗体L55の作製

## 5 2.1 抗ガングリオシドGM2ヒト抗体H鎖遺伝子の構築

ガングリオシドGM2に結合するヒト抗体（以下、L55と表記する）のH鎖をコードする遺伝子は、Epstein-Barrウイルスで形質転換されたヒトB細胞（以下、L55発現B細胞と表記する）より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によつて増幅した。L55のH鎖可変領域遺伝子の塩基配列については、Nishinakaらにより報告されている（Immunogenetics 1998；48：73-75）。

Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN社製)を用いて $1\times10^7$ 細胞のL55発現B細胞より抽出したIgM H鎖定常領域の塩基配列に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド(LMH-f3、LMH-r3)を設計した。LMH-f3(配列番号：7)はセンス方向で、LMH-r3(配列番号：8)はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。

15 1μgのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端

- 45 -

側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド LMH-r3 を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド LMH-f3 を用いた。逆転写反応は 42°C で 1 時間 30 分間反応させた。

PCR 反応溶液 (50 μL) の組成を次に示す。

5 5 μL の 10×Advantage 2 PCR Buffer、  
5 μL の 10×Universal Primer A Mix、  
0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、  
1 μL の Advantage 2 Polymerase Mix  
(以上の成分はいずれも CLONTECH 社製)

10 2.5 μL の逆転写反応産物、  
10pmole の合成オリゴヌクレオチド LMH-f3 または LMH-r3  
また反応温度条件は次のとおりである。  
- 94°C の初期温度にて 30 秒間  
94°C/5 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復

15 94°C/5 秒間、70°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復  
94°C/5 秒間、68°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 25 回反復  
最後に反応産物を 72°C で 7 分間加熱した。

PCR 産物は QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) へクローニング

20 した。塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素 ApaI (宝酒造社製) 及び SacII (宝酒造社製) で消化して得られる約 1.1 kbp の断片、3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素 ApaI (宝酒造社製) 及び NotI (宝酒造社製) で消化して得られる約 1.1 kbp の断片を混合し、pBluescript KS+ ベクター (東洋紡社製) へクローニングし、完全長 L55H 鎮遺伝子を得た。

25 動物細胞発現用ベクターへクローニングするために、合成オリゴヌクレオチド LMH-fxho、LMH-rsal を用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LMH-fxho (配列

- 4 6 -

番号：11）は前方プライマーでL55H鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつXhoI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またLMH-rsal（配列番号：12）は後方プライマーでL55H鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、SalI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

5 PCR反応溶液(50μL)の組成を次に示す。

5μLの10×PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

10 (以上の成分はいずれも東洋紡社製)、

10ngの完全長L55H鎖遺伝子を含むpBluescript KS+ベクター、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLMH-fxho、LMH-rsal

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて2分間

15 94°C/15秒間、55°C/30秒間、68°C/3分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72°Cで7分間加熱した。

増幅した遺伝子断片は、制限酵素XhoI（宝酒造社製）および制限酵素SalI（宝酒造社製）で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、pUCAGの制限酵素XhoI部位に連結し、クローニングした。

20 完成したプラスミドをpUCAG/L55Hと命名した。本プラスミドに含まれるL55H鎖の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号：19および配列番号：20に示す。

## 2.2 抗ガングリオシドGM2ヒト抗体L鎖遺伝子の構築

L55のL鎖をコードする遺伝子はL55発現B細胞より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。L55のL鎖可変領域遺伝子の塩基配列については、Nishinakaらにより報告されている(Immunogenetics 1998; 48: 73-75)。Total RNAは、実施例2.1と同様にしてL55発現B細胞より抽出した。IgM L

- 47 -

鎖定常領域の塩基配列に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド (LML-f1、LML-r1) を設計した。LML-f1 (配列番号：9) はセンス方向で、LML-r1 (配列番号：10) はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。1 μg の Total RNA を使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い 5' 末端側と 3' 末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5' 末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド LML-r1 を用い、3' 末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチド LML-f1 を用いた。逆転写反応は 42°C で 1 時間 30 分間反応した。

PCR 反応溶液 (50 μL) の組成を次に示す。

5 μL の 10×Advantage 2 PCR Buffer、

10 5 μL の 10×Universal Primer A Mix、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

1 μL の Advantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれも CLONTECH 社製)

2. 5 μL の逆転写反応産物、

15 10pmole の合成オリゴヌクレオチド LML-f1 または LML-r1

また反応温度条件は次のとおりである。

94°C の初期温度にて 30 秒間

94°C/5 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復

94°C/5 秒間、70°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復

20 94°C/5 秒間、68°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 25 回反復

最後に反応産物を 72°C で 7 分間加熱した。

PCR 産物は QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) へクローニングした。

25 塩基配列決定の後、5' 末端側非翻訳領域配列にハイブリダイズする前方プライマー L55-f (配列番号：23) 、3' 末端側非翻訳領域配列にハイブリダイズする

後方プライマーL55-r（配列番号：24）を設計し、PCRを行った。

PCR反応溶液(50 μL)の組成を次に示す。

5 μL の 10×Advantage 2 PCR Buffer、

5 μL の 10×Universal Primer A Mix、

5 0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

1 μL の Advantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれも CLONTECH 社製)

2. 5 μL の逆転写反応産物、

10pmole の合成オリゴヌクレオチド L55-f および L55-r

10 また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて 30 秒間

94°C/5 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復

- 94°C/5 秒間、70°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復

94°C/5 秒間、68°C/10 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 25 回反復

15 最後に反応産物を 72°Cで 7 分間加熱した。

PCR 産物は QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) へクローニングした。

20 塩基配列の決定後、合成オリゴヌクレオチド LML-feco、LML-rnot を用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LML-feco（配列番号：13）は前方プライマーで L55L 鎮遺伝子の 5' 末端にハイブリダイズし、かつ EcoRI 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また LML-rnot（配列番号：14）は後方プライマーで L55L 鎮遺伝子の 3' 末端にハイブリダイズし、NotI 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

25 PCR 反応溶液(50 μL)の組成を次に示す。

5 μL の 10×PCR Buffer、

- 4 9 -

1mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製) 、

5 10ngのL55L鎖遺伝子を含むpGEM-T Easyベクター、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLML-feco、LML-rnot

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて2分間

94°C/15秒間、55°C/30秒間、68°C/3分間のサイクルを30回反復

10 最後に反応産物を72°Cで7分間加熱した。

增幅した遺伝子断片は、制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素NotI(宝酒造社製)で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて精製し、pCXND3の制限酵素EcoRIおよびNotI切断部位に連結し、クローニングした。完成したプラスミドをpCXND3/L55Lと命名した。本プラスミドに含まれるL55L鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号:21および配列番号:22に示す。

### 2.3 抗ガングリオシドGM2ヒト抗体の発現ベクターの構築

L55発現ベクターを作製するために、pUCAG/L55Hを制限酵素HindIII(宝酒造社製)で消化して得られる約4.0kbpの断片をpCXND3/L55Lの制限酵素HindIII

20 切断部位に連結し、クローニングした。完成したプラスミドをpCXND3/L55IgMと命名した。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、L55遺伝子を発現する。

### 2.4 動物細胞を用いた抗ガングリオシドGM2ヒト抗体の発現

CHO細胞(DG44株)を用いた安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。

25 Gene PulserII(BioRad社製)を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。

J鎖を発現しない細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。L55 発現ベクター-pCXND3/L55IgM (25  $\mu$ g) と PBS に懸濁した CHO 細胞 ( $1 \times 10^7$  細胞/ml) の 0.75 ml を混合したものを氷上で 10 分間冷却し、キュベットに移した後に 1.5kV、25  $\mu$ FD の容量にてパルスを与えた。

5 室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、  
HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含む CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) 40mL に懸濁した。同様の培地で 50 倍希釈溶液を作製し、96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) で 24 時間培養後、Geneticin (Invitrogen 社製) を 0.5mg/mL になるように添加し  
10 て 2 週間培養した。

Geneticin 耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中の IgM 量について実施例 1.6 に示す濃度定量法で測定した。L55 高発現細胞株を順次拡大培養し、L55 安定発現細胞株 LA24、LA26、LA39、LA66、および LA74 を得た。

15 また、J鎖を発現する細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。L55 発現ベクター-pCXND3/L55IgM (25  $\mu$ g) および実施例 1.4 で作製した J鎖発現ベクター-pCOSII-Zeo/J chain (20  $\mu$ g) と PBS に懸濁した CHO 細胞 ( $1 \times 10^7$  細胞/ml) の 0.75ml を混合したものを氷上で 10 分間冷却し、キュベットに移した後に 1.5kV、25  $\mu$ FD の容量にてパルスを与えた。

20 室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、  
HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含む CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) 40mL に懸濁した。

同様の培地で 50 倍希釈溶液を作製し、96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) で 24 時間培養後、0.5mg/mL 濃度の Geneticin (Invitrogen 社製) および 0.6mg/mL 濃度の Zeocin (Invitrogen 社製) を添加して 2 週間培養した。Geneticin、Zeocin 耐性を示す形質転換細胞

- 51 -

のコロニーが観察されたウェルの培養上清中の IgM 量について実施例 1.6 に示す濃度定量法で測定した。L55 高発現細胞株を順次拡大培養し、L55 安定発現細胞株 LJ05、LJ23、LJ32、LJ49、および LJ61 を得た。

各種 L55 安定発現細胞株を 75cm<sup>2</sup> 培養フラスコ内で初発細胞密度 2x10<sup>6</sup> cells/m

5 L で培養し、培養上清中の IgM 濃度を実施例 1.6 で示した方法で測定した。結果を表 2 に示す。IgM 産生量は培養 3 日目で 7~70mg/L、培養 7 日目で 50~150mg/L であり、単一細胞が産生する能力を示す産生能は 5~40pg/cell/day であった。

実施例 1.6 で示した組換え型 L612 産生細胞株と同等またはそれ以上の産生量

が得られた。この結果より、CHO 細胞において高い産生量の組換え型 IgM 発現細

10 胞株が安定的に作製できることが明らかになった。

表 2

J鎖発現	細胞株	培養 3 日間の産生量 (mg/L)	培養 7 日間の産生量 (mg/L)	産生能 (pg/cell/day)
無し	LA24	30.7	50.6	15.3
	LA26	52.6	97.6	24.4
	LA39	58.2	99.7	29.9
	LA66	51.0	108.8	21.2
	LA74	76.0	159.4	40.7
有り	LJ05	44.4	82.5	21.3
	LJ23	17.1	N. T.	8.6
	LJ32	19.8	48.6	11.2
	LJ49	6.9	N. T.	5.2
	LJ61	26.4	53.7	14.9

N.T.:Not Tested

[実施例 3]

15 3.1 組換え型 L612 (実施例 1) および組換え型 L55 (実施例 2) の多量体形成

## の解析

組換え型 L612 (実施例 1) および組換え型 L55 の多量体の解析は、非還元 SDS-PAGE を用いて行なった。非還元 SDS-PAGE 用の電気泳動ゲルは、以下のとおり作成した。HYBRID MIXER (TOMY) 専用の容器に 30% アクリルアミド (C% = 3.3 3%) を 1.80mL、1.50M Tris-HCl pH8.8 を 3.75mL、ミリ Q 水を 3.39mL、glycerol を 2.25mL 加え混合し、溶液を 50°C に保温した。さらに 2.0% agarose を 3.75 mL 加え、再び 50°C に保温した。

その後室温に 1 分静置し、TEMED を 12 μL、25% ammonium persulfate (APS) 50 μL を加え、HYBRID MIXER (TOMY) で 15 秒攪拌、15 秒脱泡した。ディスポシリソーランジで溶液を回収し、溶液をゲルプレートに流し込み、37°C で 1 時間アクリルアミドの重合反応を行なった。その後室温で agarose を固め、完成した電気泳動ゲルは 4°C で保存した。

電気泳動バッファーは、NuPAGE Tris-Acetate 20×running buffer (Invitrogen) をミリ Q 水で 20 倍に希釈して作製した。2×サンプルバッファーは、125mM Tris-HCl pH6.8、4.0% SDS、30% glycerol、0.004% Bromophenol blue を用いた。

実施例 1 および実施例 2 で得られた組換え型 L612 (実施例 1、J鎖+、および J鎖-) および組換え型 L55 (実施例 2、J鎖+、および J鎖-) の培養上清を上記の電気泳動ゲル、電気泳動バッファー、2×サンプルバッファーを用いて定電圧 60V で 13 時間、電気泳動を行なった。その後、抗  $\mu$  鎖抗体を一次抗体に用いた Western-blotting により検出した。Western-blotting は以下のとおりになつた。

電気泳動後のゲルをセミドライ方式のプロッティング装置を用いて、PVDF 膜に転写した。転写後、Tween80 を 0.05% 含む 5% スキムミルクを用いて 2 時間、25 プロッキングを行なった。Tween80 を 0.05% 含む Tris-buffered-saline 溶液で洗浄後、一次抗体として 3000 倍希釈した Rabbit anti-Human IgM (DAKO) を用

いて 1 時間反応させた。再び洗浄後、二次抗体として 1000 倍希釈した AP-Goat Rabbit anti-IgG (H+L) Double staining grade (ZYMED) を用いて 1 時間反応させた。再び洗浄後、Amplified Alkaline Phosphatase Immuno-Blot Assist Kit (Bio-Rad) を用いて発色させた。

5 その結果、組換え型 L612 (J鎖+) は、主に L612 発現 B 細胞から得られた L6 12 の 5 量体に相当するバンドが得られた (図 1)。組換え型 L612 (J鎖-) は、主に L612 発現 B 細胞から得られた L612 の 6 量体に相当するバンドが得られた。電気泳動の各バンドについては 5 量体、あるいは 6 量体であることを電子顕微鏡で確認済みである。組換え型 L55 においても同様の結果が得られた。 (図 2)

10 この結果より、IgM 産生細胞の培養上清中の、5 量体、あるいは 6 量体の確認ができることが明らかになった。また、J鎖+で発現させた組換え型 IgM は主に 5 量体を形成しており、J鎖-で発現させた組換え型 IgM は主に 6 量体を形成していることが明らかになった。J鎖の有無をコントロールすることで、組換え型 IgM の 5 量体、および 6 量体を作り分けできることが明らかになった。

15

#### [実施例 4]

##### 4.1 L612 発現細胞株における多量体形成比率の分析

実施例 3 と同様に非還元 SDS-PAGE による電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを回収し、10% methanol, 7% acetic acid でゲルを 30 分以上洗浄した後、Run by gel stain 溶液 (Bio-Rad) を用いて 3 時間以上染色した。染色後、10% methanol, 7% acetic acid でゲルを 60 分以上脱色した。脱色後、FluorImager 595 (Molecular Dynamics) を用いて 480 nm で励起し、618 nm で各多量体のバンドを検出した (図 3)。これより、各レーンの densitogram を作製し、ピーク面積を求めることで各バンド強度を定量した。得られた会合体 (aggregate)、6 量体 (hexamer)、5 量体 (pentamer)、および 4 量体 (tetramer) の比率を表 3 に示した。本発明の方法により、IgM の多量体構造、あるいは会合体を定量的に評価できるこ

- 5 4 -

とが確認された。

表 3

	J chain	aggregate	hexamer	pentamer	tetramer
5	L612	+	5%	18%	73%
10	CA19	-	5%	82%	10%
15	CJ45	+	4%	6%	90%

[実施例 5] 組換え型ヒト抗体 L612 高產生株の作製

5.1 発現プラスミド pL612CA4 の構築

ベクターINPEP4 (Patent No. US20010019715) の CMV プロモーターおよびポリ A シグナルを除くために制限酵素 *Pvu*II 部分消化を行い、約 5.5 kb の断片を回収し環状化した。このベクターを INPEP4-dCMV と命名した。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR 遺伝子を発現する。

INPEP4-dCMV にマルチクローニングサイトを導入するために、制限酵素 *Bgl*III, *Xba*I, *Bam*HI, *Sal*II などのサイトを含むアダプター配列（配列番号：25 および 26 をアニーリングして調製した）を INPEP4-dCMV の *Asc*I, *Fse*I サイトにクローニングした。このベクターを INPEP4-dCMV (MCS) と命名した。配列番号：25 および 26 の配列を以下に示す。

CCTGATCATGAAGACGTCGACTAGTCCGGATCCCCGGAGCTCGAGCGCTCTAGATCTTAATTAAGG (配列番号：25)

CGCGCCTTAATTAAAGATCTAGAGCGCTCGAGCTCCGGGGATCCGGACTAGTCGACGTCTTCATGATCAGG  
25 CCGG (配列番号：26)

抗体 L 鎮発現ユニットをサブクローニングするために、pCXND3/L612IgM の約 3.0 kb の *Sal*II, *Pst*I 部分消化断片を pBluescript II SK<sup>+</sup> の *Sal*II, *Pst*I サイトにクローニングした。このベクターを L612CA-L/pBlue と命名した。

抗体 L鎖発現ユニットを発現ベクターに導入するために、INPEP4-dCMV(MCS)の *Xba*I, *Bgl*II サイトに L612CA-L/pBlue の約 3.0 kb の *Sal*II, *Bam*HI 断片をクローニングした。このベクターを L612CA-L4/dCMV と命名した。

抗体 H鎖発現ユニットをサブクローニングするために、pCXND3/L612IgM の約 5 4.1 kb の *Sal*II, *Pst*I 断片を pBluescrip II SK<sup>+</sup>の *Sal*II, *Pst*I サイトにクローニングした。このベクターを L612CA-H/pBlue と命名した。

抗体 H鎖発現ユニットを発現ベクターに導入するために、L612CA-L4/dCMV の 10 *Sal*II, *Bam*HI サイトに L612CA-H/pBlue の約 4.1 kb の *Sal*II, *Bam*HI 断片をクローニングした。このベクターを pL612CA4 と命名した。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR 遺伝子、L612 遺伝子 (H鎖、L鎖) を発現する。

## 5.2 エレクトロポレーション、Geneticin選抜

CHO 細胞 DG44 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法により行った。発現プラスミド pL612CA4 を制限酵素 *Pvu*I で一晩消化し、フェノール抽出、クロロホルム抽出の後、エタノール沈殿により精製し TE に溶解した。HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) で培養した細胞と精製した *Pvu*I 消化 pL612CA4 を混ぜ、キュベットに入れた後に、遺伝子導入装置でパルスを与えて遺伝子を導入した。

遺伝子導入後、キュベットの細胞を HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) 10 mL に加え、同培地で適度に希釈した後 96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$ L/well 播種した。プレーティング終了後、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 8% CO<sub>2</sub> 濃度) 内で培養を行った。CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 日間培養後、適量の Geneticin (Invitrogen 社製)、ならびに HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) を 100  $\mu$ L/well ずつ加え、コロニーが形成されるまでさらに培養した。得られた單一コロニーについて実施例 1 の 1.6 に記載の方法に従って

培養上清中の IgM 濃度を測定後、適量 Geneticin (Invitrogen 社製) 、ならびに HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 製) を用いて 24 ウェル培養用プレートに拡大培養した。その後、3~7 日おきに拡大培養を行い、L612 高產生株を選抜した。

5

### 5.3 MTX 選抜

Geneticin 選抜で取得した L612 高產生株を適量の MTX (Methotrexate) を含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) に懸濁し、96 ウェル培養用プレートに播種した。プレーティング終了後、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、8% CO<sub>2</sub> 濃度) 10 内でコロニーが形成されるまで培養を行った。得られた單一コロニーについて実施例 1 の 1.6 に記載の方法に従って培養上清中の IgM 濃度を測定後、24 ウェル培養用プレートまたは 48 ウェル培養用プレートに拡大培養した。その後、3~7 日おきに拡大培養を行い、L612 高產生株を選抜した。MTX 濃度を段階的に上げながらこの操作を繰り返すことで、遺伝子増幅を誘引させて表 4 に示す L612 高產生株を選抜した。

表 4

J鎖発現	細胞株	培養 3 日間の產生量 (mg/L)	產生能 (pg/cell/day)
無し	CA4-37-500-3	116.7	194.6

### 5.4 培養上清中の IgM 濃度の測定法 (1)

HPLC システム : Water 社製 HPLC system Alliance

20 2487 Dual Absorbance Detector、2690 Separations Module  
Millennium 32 ver. 3.21

使用カラム : GPC カラム Superose 6 HR 10/30 (Amersham Biosciences 製)

標準品 : 凍結された L612 IgM 精製品を融解後いったん遠心し、その上清を小分注して凍結保存したものを GPC 用標準品として使用した。

移動相：D-PBS に、Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monolaurate を0.02%、アジ化ナトリウムを0.05%となるように添加して調製した。

HPLC 条件：移動相流量0.5 mL/min、測定波長280 nm、試料注入量100  $\mu$ L

操作は以下のようにして行った。37° C で数分保温して融解した GPC 用標準品の

5 波長280 nm における吸光度を分光光度計により測定し、その値から波長280 nm における吸光度が0.12となるような希釈率を算出した。

求めた希釈率にて GPC 標準品を希釈したものを作成して得られたピーク面積と適度に希釈して標準品と同容量注入した未知試料のピーク面積と希釈倍率から未知試料の280 nm における吸光度を算出した。得られた吸光度の値と L612 の吸光度

10  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1.4$  より次の式を用いて L612 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) を求めた。

$$\text{L612 濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \text{吸光度 (Abs280)} \div 1.4 \times 1000$$

### 5.5 哺乳動物由来成分不含培地でのクローニング

MTX 選抜で得られた L612 高產生株を適当量 の MTX を含有する哺乳動物由来成

15 分不含培地 (Invitrogen 社製) に懸濁し、限界希釈法によって 1 cell/200  $\mu$ L になるよう希釈を行った。これを 96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$ L/well ずつ播種した。これに HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含有する哺乳動物由来成分不含培地で培養した DG44 株を適当量 の MTX を含有する哺乳動物由来成分不含培地に  $1 \times 10^5$  cells/mL になるよう懸濁後、100  $\mu$ L/well ずつ播種した。CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、8% CO<sub>2</sub> 濃度) 内に静置し、7 日後に適当量の Geneticin (Invitrogen 社製)、適当量 の MTX を含有する哺乳動物由来成分不含培地を 100  $\mu$ L 添加後、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、8% CO<sub>2</sub> 濃度) 内に静置した。約 2 週間後、得られた単一コロニーについて実施例 1 の 1.6 に記載の方法に従って培養上清中の IgM 濃度を測定後、適当量 の MTX を含有する哺乳動物由来成分不含培地を用いて 24 ウェル培養用プレートに拡大培養した。その後、

3~7日おきに拡大培養を行い、最終的に5.4のゲルろ過クロマトグラフィ法に従って培養上清中のIgM濃度を測定し、表5に示すL612高產生クローンを樹立した。

表5

J鎖発現	クローン	培養3日間の 產生量(mg/L)	培養7日間の 產生量(mg/L)	產生能 (pg/cell/day)
無し	PSS-37H3	42.0	337.2	47.0

5

### 5.6 培養上清中のIgM濃度の測定法(2)

HPLCシステム：HITACHI LaChrom HPLC装置 (HITACHI L-7120 pump(A, B)、L-7200 autosampler、L-7420 UV-VIS detector、L-7610 degasser)

データ解析ソフトウェア：D-7000型 Advanced HPLC System Manager (HITACHI)

10 分析用カラム：TOSHO TSKgel G4000SW<sub>XL</sub> 7.8mmIDx300 mm (Cat No. 08542、Column No. G0151)

標準品：MABON01R306 (5.4の標準品と同等の品質を有するもの) を使用した。

移動相：50 mM Phosphate-Buffer, 500 mM KCl, pH 7.4, 0.05% NaN<sub>3</sub> (pH7.4)

HPLC条件：0.5 mL/min (20min)→1.0 mL/min、測定波長280 nm、試料注入量100

15

$\mu$  L

検量線：1600、800、100  $\mu$  g /mL の3点で作成した。

### 5.7 哺乳動物由来成分不含培地でのL612高產生株の回分培養と流加培養

作製したL612高產生株を、初発細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL にて回分培養法もしくは流加培養法で培養を行い、培養上清中のIgM濃度をゲルろ過クロマトグラフィ法(5.4, 5.6の方法参照)にて測定した。哺乳動物由来成分不含培地を用い、加水分解物として回分培養法では酵母抽出物を、流加培養法では魚肉抽出物を使用した。増殖因子としては、回分培養法でインスリンを、流加培養法ではインスリンとインスリン様増殖因子-Iを用いた。回分培養法においてのL612產生量は、

培養 6 日目で 269.9 mg/L であった (5.4 の方法による)。一方流加培養法においての L612 產生量は、培養 6 日目で 347.4 mg/L、培養 14 日目で 1669.1 mg/L であった (5.6 の方法による)。IgM はイムノグロブリンの中でも多量体を形成するために組換え体は発現量が低く、大量に調製することが困難とされていたが、  
5 加水分解物の使用と流加培養法を組み合わせて用いることにより、CHO 細胞において高い產生量の組換え型 IgM の調製が可能であることが明らかとなった。

#### 〔実施例 6〕 単一の発現ベクターによる 5 量体 L612 產生株の作製

##### 6.1 発現プラスミド pL612pentaCA4 の構築

10 INPEP4-dCMV (MCS) の XhoI, BglIII サイトに、L612CA-H/pBlue から約 4.1 kb の SalI-BamHI の抗体 H 鎖発現ユニットをクローニングして L612CA-H3/dCMV を作製した。L612CA-H3/dCMV の BamHI, SalI サイトに、L612CA-L/pBlue から約 3.0 kb の BamHI-SalI の抗体 L 鎖発現ユニットをクローニングして pL612CA3 を作製した。

15 抗体 J 鎖発現ユニットを構築するため、pCOSII-Zeo/J chain を鑄型とする配列番号 27 : GAGGAATTCCACCATGAAGAACCC および配列番号 28 : GAGGCGGCCGCTTAGTCAGGATAGCAG をプライマーとした PCR 反応により抗体 J 鎖遺伝子を增幅し、pCR-Blunt II-TOP0 (インビトロジェン社製) にクローニングした。SV40 のポリ A シグナルは pSV2-dhfr (Subramani ら、Mol. Cell. Biol. 1981; 1: 854-864) を鑄型とする配列番号 29 : AAAAGCGGCCGCGATCATAATCAGCCATACCA および配列番号 30 : AAAACTCGAGAAGCTTAGACATGATAAGATAACATTG をプライマーとした PCR 反応により増幅し、pT7-Blue (Novagen 社製) にクローニングした。

20 pCXND3 の CAG プロモーターとして約 1.7 kb の SpeI-EcoRI 断片、クローニングした J 鎖遺伝子の約 0.5 kb の EcoRI-NotI 断片、クローニングした SV40 ポリ A シグナルの約 0.3 kb の NotI-XhoI 断片を pCR-Blunt II-TOP0 の SpeI-XhoI サイトの間で組み合わせた。このベクターを pCRCAGproJpA と命名した。

- 6 0 -

pCRCAGproJpA の *Xba*I サイトを、平滑化して *Bam*HI linker (pCCCGGATCCGGG (配列番号：31)、タカラバイオ社製)を付加することによって *Bam*HI サイトに変換し、約 2.5 kb の *Bam*HI 断片として抗体 J鎖発現ユニットを pL612CA3 の *Bam*HI サイトにクローニングした。得られたプラスミドを pL612pentaCA4 と命名

5 した。

本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR 遺伝子、L612 遺伝子 (H鎖、L鎖、J鎖) を発現する。

## 6.2 エレクトロポレーション、Geneticin選抜

10 CHO 細胞 DG44株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法により行った。発現プラスミド pL612pentaCA4を制限酵素 *Pvu*I で一晩消化し、フェノール抽出、クロロホルム抽出の後、エタノール沈殿により精製し TE に溶解した。HT supplement (Invitrogen 社製)を1倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製)で培養した細胞と精製した *Pvu*I 消化 pL612pentaCA4を混ぜ、

15 キュベットに入れた後に、遺伝子導入装置でパルスを与えて遺伝子を導入した。

遺伝子導入後、キュベットの細胞を HT supplement (Invitrogen 社製)を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製)10 mL に加え、同培地で適度に希釈した後 96 ウエル培養用プレートに播種した。プレーティング終了後、CO<sub>2</sub>インキュベーター (37°C、8% CO<sub>2</sub>濃度) 内で 1 日間培養し、適当量の

20 Geneticin (Invitrogen 社製)、ならびに HT supplement (Invitrogen 社製)を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製)を等量加え、コロニーが形成されるまでさらに培養した。得られた單一コロニーについて実施例 1 の 1.6 に記載の方法に従って培養上清中の IgM 濃度を測定することにより高産生株を選抜し、3~7 日おきに順次拡大培養を行うことにより L612 産生株 CA4-119 ならび

25 に CA4-139 を得た。

### 6.3 多量体形成の解析

Geneticin 選抜で得られた細胞株を S100 spinner flask にて初発細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL で 3 日間培養した培養上清を用い、実施例 3 に示す方法に従い 非還元 SDS-PAGE を行い、抗  $\mu$  鎖抗体を一次抗体に用いた Western-blotting を 5 行った。その結果 pL612pentaCA4 導入株では、主として L612 発現 B 細胞から得られた L612 の 5 量体に相当するバンドが得られ、6 量体に相当するバンドは検出されなかった（図 4）。J 鎖発現単位を H 鎖ならびに L 鎖発現単位とともに単一の発現ベクター上に載せ、H 鎖ならびに L 鎖発現に対する J 鎖の発現レベルを 適切に制御することによって、5 量体 L612 を主として生成させることが可能で 10 あることが明らかとなった。

### 〔実施例 7〕組換え型 L612 の CDC 活性

-  $^{51}\text{Cr}$ -クロム酸ナトリウムにて放射性標識した標的細胞である M1 メラノーマ細胞  $1 \times 10^4$  個/50  $\mu\text{L}$ /well にて適宜希釈した抗体溶液を 50  $\mu\text{L}$ /well 添加し、 15 組換え型 L612 (J 鎖- ; CA19) あるいは組換え型 L612 (J 鎖+ ; CJ45) がそれぞれ抗体の最終濃度 0.16, 0.8, 4, 20, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるようにして氷上にて 60 分間静置した。続いて、各ウェルに補体源としてヒト由来血漿 100% ないし全血を 100  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、5%炭酸ガスインキュベーター中に 37°C で 90 分間静置した。遠心 (1000 rpm, 5 分間, 4°C) 後、各ウェルより上清を 100  $\mu\text{L}$  ずつ回収し、 20  $\gamma$  カウンター (COBRA II AUTO-GAMMA, MODEL D5005, Packard Instrument Company) にて遊離された放射活性を測定した（図 5）。CDC 活性即ち細胞傷害活性(%)は  $(A-C)/(B-C) \times 100$  により計算した。A は各ウェルにおける放射活性(cpm)、B は標的細胞浮遊液を 50  $\mu\text{L}$ 、10% NP-40 水溶液 (Nonidet® P-40, Code No. 252-23, ナカライテスク株式会社) を 20  $\mu\text{L}$ 、HAVB を 130  $\mu\text{L}$  添加したウェルにおける放 25 射活性(cpm)の平均値、C は標的細胞浮遊液を 50  $\mu\text{L}$ 、HAVB を 150  $\mu\text{L}$  添加したウ エルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。試験は triplicate にて行い、特異

的クロム遊離率について平均値及び標準誤差を算出した。いずれの条件でも、組換型 L612(CA19)は、L612 よりも強い CDC 活性を誘導し、50% Lysis を誘導する濃度の比は、5.8 ないし 5.9 倍であった。また、血球の共存によって、CDC 活性の顕著な減弱は見られなかった。

5

### 〔実施例 8〕 6 量体 IgM を優先的に產生する細胞株の作製 (1)

#### 8.1 発現プラスミド pL612CA3 の構築

INPEP4-dCMV(MCS)の *Xho*I, *Bgl*II サイトに、L612CA-H/pBlue から約 4.1 kb の *Sal*I-*Bam*II の抗体 H鎖発現ユニットをクローニングして L612CA-H3/dCMV を作製した。L612CA-H3/dCMV の *Bam*II, *Sal*I サイトに、L612CA-L/pBlue から約 3.0 kb の *Bam*II-*Sal*I の抗体 L鎖発現ユニットをクローニングして pL612CA3 を作製した。

#### 8.2 エレクトロポレーション、Geneticin 選抜

CHO 細胞 DG44 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法により行った。発現プラスミド pL612CA3 を制限酵素 *Pvu*I で一晩消化し、フェノール抽出、クロロホルム抽出の後、エタノール沈殿により精製し TE に溶解した。HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) で培養した細胞と精製した *Pvu*I 消化 pL612CA3 を混ぜ、キュベットに入れた後に、遺伝子導入装置でパルスを与えて遺伝子を導入した。遺伝子導入後、キュベットの細胞を HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) 10 mL に加え、同培地で適度に希釈した後 96 ウェル培養用プレートに播種した。プレーティング終了後、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 8% CO<sub>2</sub> 濃度) 内で 1 日間培養し、適当量の Geneticin (Invitrogen 社製)、ならびに HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) を等量加え、コロニーが形成されるまでさらに培養した。得られた單一コロニーについて実施例 1 の 1.6 に

記載の方法に従って培養上清中の IgM 濃度を測定することにより高產生株を選抜し、3~7 日おきに順次拡大培養を行うことにより L612 產生株 CA3-1016 を得た。

### 5 8.3 MTX 選抜

Geneticin 選抜で取得した L612 產生株 CA3-1016 を適当量の MTX (Methotrexate)を含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製)に懸濁し、96 ウエル培養用プレートに播種した。プレーティング終了後、CO<sub>2</sub>インキュベーター (37°C、8% CO<sub>2</sub>濃度) 内でコロニーが形成されるまで培養を行った。得られた單一コロニーについて実施例 1 の 1.6 に記載の方法に従って培養上清中の IgM 濃度を測定することにより高產生株を選抜し、3~7 日おきに順次拡大培養を行うことにより L612 產生株 CA3-1016-50-11 を得た。

### 8.4 哺乳動物由来成分不含培地での L612 高產生株の回分培養

15 作製した L612 產生株 CA3-1016-50-11 を、初発細胞密度  $2\sim3\times10^5$  cells/mL にて回分培養法で培養を行い、培養上清中の IgM 濃度を実施例 5 の 5.4 に記載のゲルろ過クロマトグラフィー法にて測定した。哺乳動物由来成分不含培地を用い、加水分解物として酵母抽出物を使用した。増殖因子としてはインスリンを用いた。回分培養法での L612 產生量は、培養 3 日目で 56.0 mg/L であった。

20

### 8.5 精製方法

回分培養から得られた培養上清を、150 mM NaCl 含有 20 mM りん酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)で平衡化した陰イオン交換樹脂充填カラムに負荷して L612 を吸着せしめ、次いで同平衡化緩衝液で洗浄した後、350 mM NaCl 含有 20 mM りん酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)で L612 を溶出した。この溶出画分を 10 mM りん酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で平衡化したハイドロキシアパタイト充填カラムに負

荷して L612 を吸着せしめ、次いで同平衡化緩衝液で洗浄した後、350 mM りん酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で L612 を溶出した。これら 2 種のカラムクロマトグラフィーでの不純物分離精製を行った後、得られた L612 画分を、移動相として 300 mM NaCl 含有 20 mM 酢酸(pH6.0)を使用したゲルろ過にて会合体の分離除去を行った。ゲルろ過で得られた目的画分を 0.2  $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過を行い精製 L612 画分とした。

#### [実施例 9] 6 量体 IgM を優先的に產生する細胞株の作製 (2)

##### 9.1 エレクトロポレーション、Geneticin 選抜

CHO 細胞 DG44 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法により行った。発現プラスミド pCXND3/L612IgM を制限酵素 *Pvu*I で一晩消化し、フェノール抽出、クロロホルム抽出の後、エタノール沈殿により精製し TE に溶解した。HT supplement (Invitrogen 社製)を1倍濃度で含有する CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製)で培養した細胞と精製した *Pvu*I 消化 pCXND3/L612IgM を混ぜ、キュベットに入れた後に、遺伝子導入装置でパルスを与えて遺伝子を導入した。

遺伝子導入後、キュベットの細胞を CHO-S-SFMII 培地(Invitrogen 社製、HT 不含)80 mL に加え、同培地で適度に希釈した後 96 ウェル培養用プレートに播種した。プレーティング終了後、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、8% CO<sub>2</sub> 濃度) にプレートを入れコロニーが形成されるまで培養した。得られた單一コロニーについて実施例 1 の 1.6 に記載の方法に従って培養上清中の IgM 濃度を測定することにより高產生株を選抜し、3~7 日おきに順次拡大培養を行うことにより L612 產生株 DG44(HT-)30 を得た。

##### 9.2 哺乳動物由来成分不含培地での L612 高產生株の連続回分培養

作製した L612 產生株 DG44(HT-)30 を、初発細胞密度 2~3  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL にて

連続回分培養法で培養を行い、培養上清中の IgM 濃度を実施例 5 の 5.4 に記載の  
ゲルろ過クロマトグラフィー法にて測定した。CHO-S-SFMII 培地(Invitrogen 社製、  
HT 不含)を用い、加水分解物として酵母抽出物を使用した。増殖因子としてはイ  
ンスリンを用いた。3 日毎の 4 回の連続した回分培養においての L612 産生量は、  
5 各々 28.7 mg/L, 32.0 mg/L, 25.7 mg/L, 22.2 mg/L であった。

### 9.3 精製方法

4 回の回分培養から得られた培養上清を、それぞれ 150 mM NaCl 含有 20 mM  
りん酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)で平衡化した陰イオン交換樹脂充填カラムに負  
10 荷して L612 を吸着せしめ、次いで同平衡化緩衝液で洗浄した後、350 mM NaCl  
含有 20 mM りん酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)で L612 を溶出した。この溶出画分  
を 10 mM りん酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で平衡化したハイドロキシアパタイト  
充填カラムに負荷して L612 を吸着せしめ、次いで同平衡化緩衝液で洗浄した後、  
350 mM りん酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で L612 を溶出した。これら 2 種のカラ  
15 ムクロマトグラフィーでの不純物分離精製を行った後、得られた L612 画分を、  
移動相として 300 mM NaCl 含有 20 mM 酢酸(pH6.0)を使用したゲルろ過にて会合  
体の分離除去を行った。4 回の各精製での L612 回収率はそれぞれ実施例 5 の 5.4  
に記載のゲルろ過クロマトグラフィー法にて測定し、83.7%、45.6%、63.6%、  
75.6% であった。4 回分のゲルろ過での目的画分を混合し、0.2  $\mu$ m のメンブレン  
20 フィルターでろ過を行い精製 L612 画分とした。

### 実施例 10 6 量体 IgM を優先的に產生する細胞株における多量体形成比率の 分析

実施例 8 および実施例 9 で得られたそれぞれの精製 L612 画分について、実施  
25 例 4 に記載の方法と同様の方法で IgM の多量体形成比率を分析した。但し、電

- 6 6 -

気泳動時のゲルの組成、および電気泳動バッファーを以下のとおり変更して実施した。

SDS-PAGE 用の電気泳動ゲルは、HYBRID MIXER (TOMY) 専用の容器に 30% acrylamide (acrylamide:N,N'-methylenbisacrylamide = 29:1) を 1.85 mL、  
5 1.50M Tris-Acetate pH 7.0 を 3.75 mL、ミリ Q 水を 3.34 mL、glycerol を 2.25 mL 混合し、溶液を 50°C で保温した。さらに 2.0% agarose を 3.75 mL 加え、再び 50°C で保温した。

その後室温に 1 分放置し、TEMED を 12 μL、25% ammonium persulfate(APS) 50 μL を加え、HYBRID MIXER (TOMY) で 15 秒攪拌、15 10 秒脱泡した。ディスポシリンジで溶液を回収し、溶液をゲルプレートに流し込み、37°C で 1 時間アクリルアミドの重合反応を行った。その後室温で agarose を固め、完成した電気泳動ゲルは 4°C で保存した。

電気泳動バッファーは、Tris(hydroxymethyl)aminomethane を 6.06g、Tricine を 8.96g、および SDS を 1g をミリ Q 水で 1000 mL にメスアップする 15 ことにより調製した。

会合体 (aggregate) 、6 量体 (hexamer) 、5 量体 (pentamer) 、および 4 量体 (tetramer) の比率を表 6 に示した。

表 6

20	J chain	aggregate	hexamer	pentamer	tetramer
CA3-1016-50-11	-	13%	53%	27%	7%
DG44(HT-)30	-	11%	76%	9%	4%

25

#### 産業上の利用の可能性

本発明は、IgM の生産能力の高い細胞を提供する。本発明に基づいて構築された、IgM 産生細胞は、たとえば細胞融合法によって樹立された IgM 産生細胞と比

較して、高い IgM 産生能力を有する。IgM は IgG と異なり、5 量体あるいは 6 量体といった多量体構造を有する。そのため、細胞あたりの産生量を高めることは、一般に IgG よりも難しい。つまり、IgM の産生能力を高められた本発明による IgM 産生細胞、あるいはこの細胞を利用した IgM の産生方法は、きわめて困難な課題を解決した成果であると言うことができる。

また本発明は、5 量体の IgM、および 6 量体の IgM の産生方法を提供する。IgM 分子には、5 量体および 6 量体の構造が存在することはすでに知られていた。しかし、いずれかの構造を有する IgM を優先的に製造するための方法は知られていなかつた。本発明は、形質転換に利用する IgM 遺伝子における J 鎖の有無によって、5 量体あるいは 6 量体のいずれかの構造を有する IgM を優先的に産生させることに成功した。

このようにして産生した 6 量体の IgM は、産生した 5 量体の IgM と比較して細胞障害作用が強いことが確認された。本発明は、6 量体構造の組換えヒト IgM を産生し、ヒト補体を用いて組換えヒト IgM の強い細胞障害作用を示した初めての知見である。このようなことから、本発明の方法は 6 量体構造の IgM を優先的に製造し、IgM の細胞障害作用を利用した抗体医薬を得る方法として理想的である。

更に本発明は、5 量体および 6 量体の IgM を解析することができる方法を提供了。公知の方法では、IgM の多量体構造を識別することが難しかつた。本発明の解析方法によれば、IgM の多量体構造を正しく識別することができる。本発明の IgM の解析方法の利用によって、ある製造方法によって得られた IgM に占める 5 量体あるいは 6 量体の割合を正しく知ることができる。いずれの構造を有する IgM がどの程度含まれているのかを明らかにすることは、IgM の製造技術の評価において重要である。しかも本発明の解析方法は、RI を必要としない。RI が不要な解析方法は、医薬品のあらゆる製造工程の評価に有用である。

## 請求の範囲

1. 100 mg/L 以上の IgM を產生できる形質転換細胞。
2. 35 pg /cell /day 以上の IgM を產生できる形質転換細胞。
- 5 3. 真核細胞である請求項 1 または請求項 2 に記載の形質転換細胞。
4. 原核細胞である請求項 1 または請求項 2 に記載の形質転換細胞。
5. 哺乳動物細胞である請求項 3 に記載の形質転換細胞。
6. 株化細胞である請求項 1 ～請求項 5 のいずれかに記載の形質転換細胞。
7. 非リンパ球系細胞株である請求項 6 に記載の形質転換細胞。
- 10 8. CHO 細胞株である請求項 7 に記載の形質転換細胞。
9. 同じベクター上に(1)IgM H 鎖をコードする塩基配列および(2)IgM L 鎖をコ  
ードする塩基配列の両方を有する発現ベクター、あるいは前記遺伝子(1)お  
よび(2)を含む遺伝子断片。
- 10 10. 同じベクター上に(1)IgM H 鎖をコードする塩基配列、(2)IgM L 鎖をコ  
ードする塩基配列、および(3)IgM J 鎖をコードする塩基配列を有する発現ベ  
クター、あるいは前記遺伝子(1)、(2)、および(3)を含む遺伝子断片。
- 15 11. 転写調節配列により IgM の分泌が制御される請求項 9 または請求項 10  
に記載の発現ベクターあるいは遺伝子断片。
12. 転写調節配列が、アデノウイルス 2 型主後期プロモーター、シミアンウイ  
ルス 40 初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス LTR プロモーター、単  
純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター、サイトメガロウイル  
スプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子 1a プロモーター、ウシ成長ホ  
ルモンプロモーター、β アクチン遺伝子プロモーター、および CAG プロ  
モーターからなる群から選択される請求項 11 に記載の発現ベクターある  
20 いは遺伝子断片。
- 25 13. 転写調節配列が、シミアンウイルス 40 初期プロモーター、サイトメガロ

ウイルスプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子1 $\alpha$ プロモーター、およびCAGプロモーターからなる群から選択される請求項1～2に記載の発現ベクターあるいは遺伝子断片。

14. 請求項9～請求項13のいずれかに記載のベクターあるいは遺伝子断片で形質転換された形質転換細胞。  
5
15. 請求項1～請求項8のいずれかに記載の形質転換細胞から選択される、請求項14に記載の形質転換細胞。
16. 発現ベクターまたは遺伝子断片が、J鎖をコードする塩基配列を含んでいる請求項14または請求項15に記載の形質転換細胞。
- 10 17. 前記ベクターまたは遺伝子断片がIgM J鎖をコードする塩基配列を有し、かつ60%以上の含量を持つ5量体IgMを產生する請求項14～請求項16のいずれかに記載の形質転換細胞。
18. 80%以上の含量を持つ5量体IgMを產生する請求項17に記載の形質転換細胞。
- 15 19. 前記ベクターまたは遺伝子断片がIgM J鎖をコードする塩基配列を有さず、かつ50%以上の含量を持つ6量体IgMを產生する請求項14または請求項15に記載の形質転換細胞。
20. 80%以上の含量を持つ6量体IgMを產生する請求項19に記載の形質転換細胞。
- 20 21. 前記ベクターまたは遺伝子断片がIgM J鎖をコードする塩基配列を有し、かつ產生する5量体と6量体の比（5量体／6量体比）が1.5以上であるIgMを產生する請求項14～請求項16のいずれかに記載の形質転換細胞。
22. 前記ベクターまたは遺伝子断片がIgM J鎖をコードする塩基配列を有さず、かつ產生する6量体と5量体の比（6量体／5量体比）が1.5以上であるIgMを產生する請求項14または請求項15に記載の形質転換細胞。  
25

23. IgM H鎖およびIgM L鎖をコードする遺伝子を含む発現ベクターまたは遺伝子断片が、J鎖をコードする塩基配列を含まず、かつ共形質転換によりJ鎖をコードする塩基配列が発現可能に導入されている請求項14または請求項15に記載の形質転換細胞。

5 24. 請求項1～請求項8、並びに請求項14～請求項23のいずれかに記載の細胞を培養し、IgMを採取する工程を含むIgMを製造する方法。

25. 請求項1～請求項8、並びに請求項14～請求項23のいずれかに記載の細胞培養物の培養上清からIgMを精製する工程を含む、実質的に純粋なIgMを製造する方法。

10 26. 請求項24に記載の方法により得られるIgM。

27. 請求項25に記載の方法により得られる実質的に純粋なIgM。

28. ヒト抗体、マウス抗体、ヒトキメラ抗体またはヒト化抗体である請求項26または請求項27に記載のIgM。

29. 実質的に純粋な5量体あるいは6量体である請求項26～請求項28のいずれかに記載のIgM。

15 30. CHO細胞が付加する糖鎖を有する実質的に純粋な5量体または6量体IgM。

31. 抗糖鎖抗体である請求項26～請求項30のいずれかに記載のIgM。

32. 抗ガングリオシド抗体である請求項31に記載のIgM。

20 33. 抗GM2またはGM3抗体である請求項32に記載のIgM。

34. 配列番号：1に記載の塩基配列、または配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

35. 配列番号：3に記載の塩基配列、または配列番号：4に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

25 36. 請求項34に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む単離された蛋白質。

- 71 -

37. 請求項35に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む単離された蛋白質。
38. 請求項36に記載の蛋白質と請求項37に記載の蛋白質を構成単位として含むIgM。
- 5 39. 更にIgM J鎖を含む請求項38に記載のIgM。
40. 5量体である請求項39に記載のIgM。
41. 配列番号：19に記載の塩基配列、または配列番号：20に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。
42. 配列番号：21に記載の塩基配列、または配列番号：22に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。
- 10 43. 請求項41に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む単離された蛋白質。
44. 請求項42に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む単離された蛋白質。
- 15 45. 請求項43に記載の蛋白質と請求項44に記載の蛋白質を構成単位として含むIgM。
46. 更にIgM J鎖を含む請求項45に記載のIgM。
47. 5量体である請求項46に記載のIgM。
48. 請求項26～請求項33、請求項38、および請求項45のいずれかに記20 載のIgMを含有する医薬組成物。
49. 80%以上の5量体IgMを含有する医薬組成物。
50. 50%以上の6量体IgMを含有する医薬組成物。
51. 80%以上の6量体IgMを含有する請求項50に記載の医薬組成物。
52. 5量体／6量体比が1.5以上であるIgMを含有する医薬組成物。
- 25 53. 6量体／5量体比が1.5以上であるIgMを含有する医薬組成物。
54. 次のa)-c)からなる群から選択された少なくとも1つの条件を満たすポリ

- 72 -

アクリルアミドゲルを担体として SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって IgM を分離する工程を含む、IgM の多量体を分析する方法。

- a)高温で重合させたポリアクリルアミドゲル、
- b)高濃度の過硫酸アンモニウム、及び、グリセロールを含有するポリアクリルアミドゲル、および

5 c)重合させる前に攪拌、脱泡により均一化したポリアクリルアミドゲル、

5 5. 条件 a)における温度が 37°C 以上である請求項 5 4 に記載の方法。

5 6. 条件 b)における過硫酸アンモニウムの濃度が 0.25% 以上である請求項 5 4 に記載の方法。

10 5 7. ポリアクリルアミドゲルが、前記 a)-c)からなる群から選択された少なくとも 2 つの条件を満たすポリアクリルアミドゲルである請求項 5 4 に記載の方法。

5 8. ポリアクリルアミドゲルが、前記 a)-c)の全ての条件を満たすポリアクリルアミドゲルである請求項 5 4 に記載の方法。

15 5 9. 電気泳動用のバッファーが Tris-acetate SDS 泳動バッファーである請求項 5 4 に記載の方法。

6 0. IgM の多量体が、IgM の 5 量体および／または 6 量体である請求項 5 4 に記載の方法。

6 1. IgM の会合体を分析することを特徴とする請求項 5 4 に記載の方法。

20 6 2. RI を使用しないことを特徴とする請求項 5 4 に記載の分析方法。

6 3. 電気泳動後に分離された IgM の多量体を定量する工程を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

6 4. 次の a)-c)からなる群から選択された少なくとも 1 つの条件を満たすポリアクリルアミドゲルからなる、IgM の多量体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離するための電気泳動用ゲル。

- a)高温で重合させたポリアクリルアミドゲル、

- 73 -

b)高濃度の過硫酸アンモニウム、及び、グリセロールを含有するポリアクリルアミドゲル、および

c)重合させる前に攪拌、脱泡により均一化したポリアクリルアミドゲル、

6 5. 次の a)-c)からなる群から選択された少なくとも 1 つの工程を含む、IgM  
5 の多量体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離するため  
の電気泳動用ゲルの製造方法。

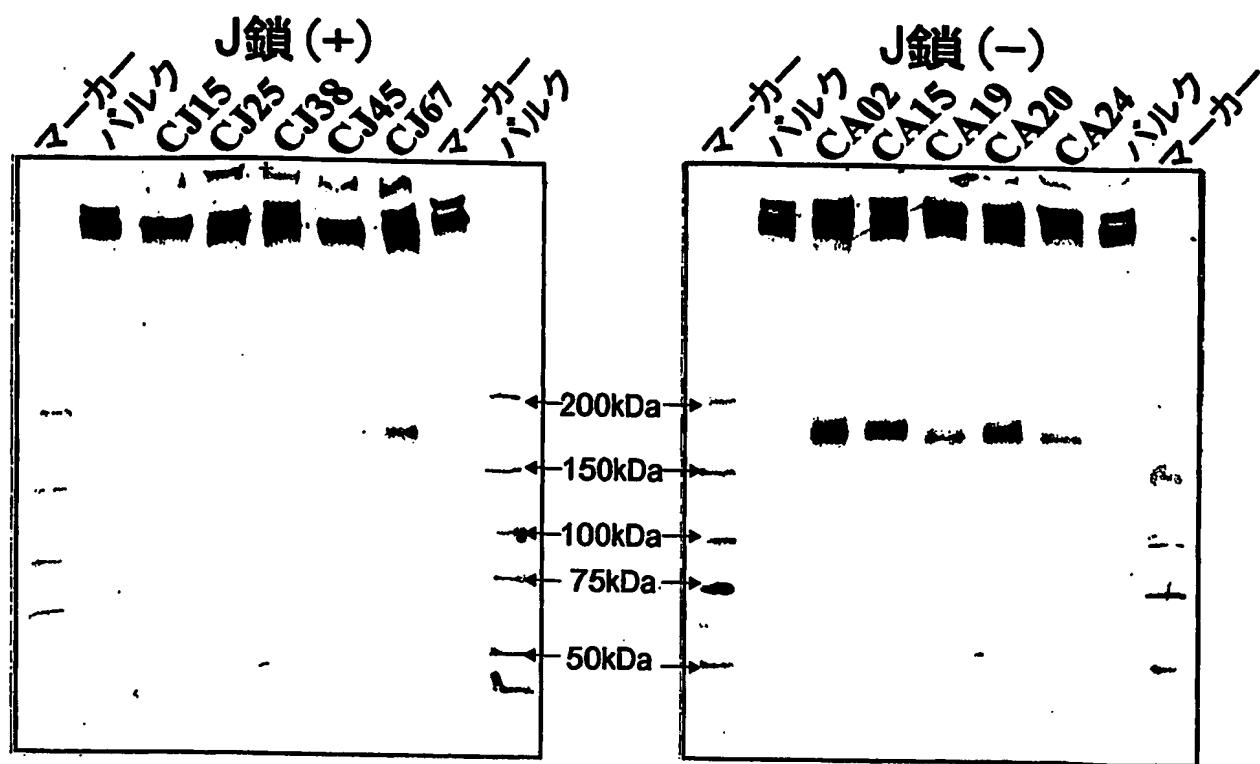
a)アクリルアミドを高温で重合させる工程、

b)アクリルアミドに高濃度の過硫酸アンモニウムを添加する工程、および

c)重合させる前にアクリルアミドを攪拌、および脱泡により均一化する工  
10 程、

1 / 5

図 1

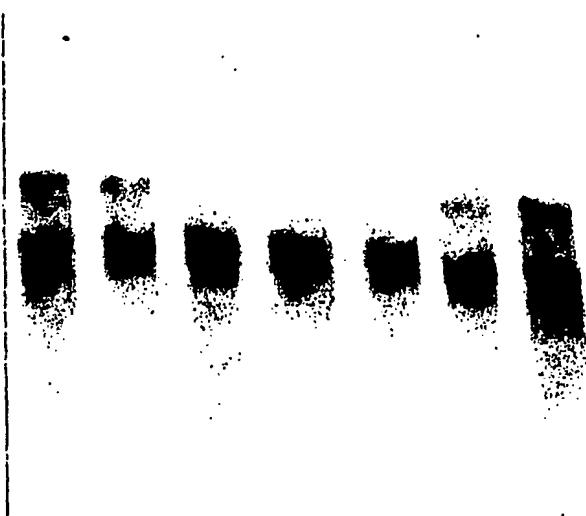


2 / 5

図 2

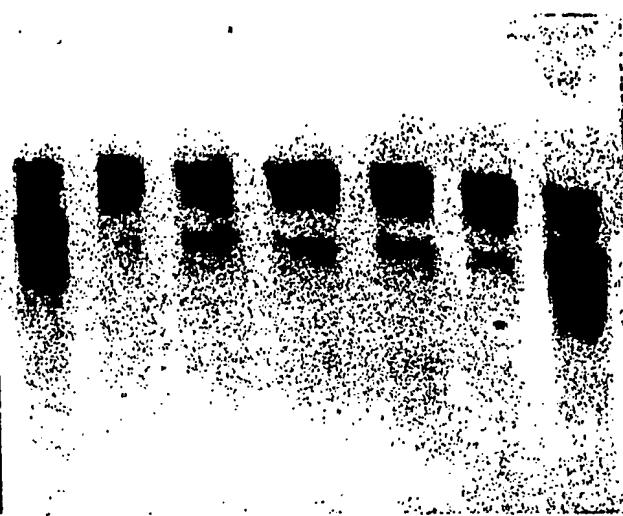
LJ (J鎖+)

St 05 23 32 49 61 St



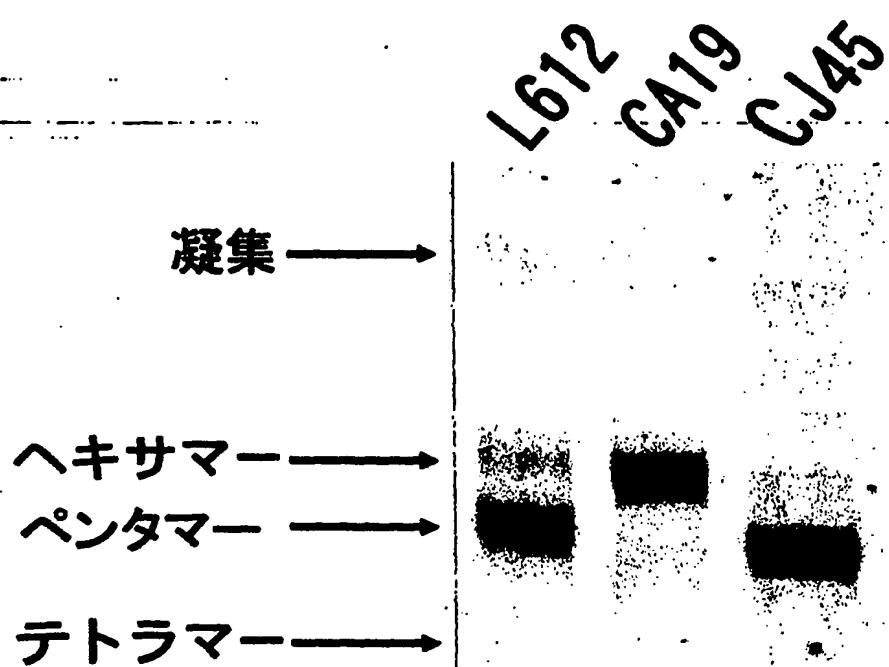
LA (J鎖-)

St 24 26 39 66 74 St



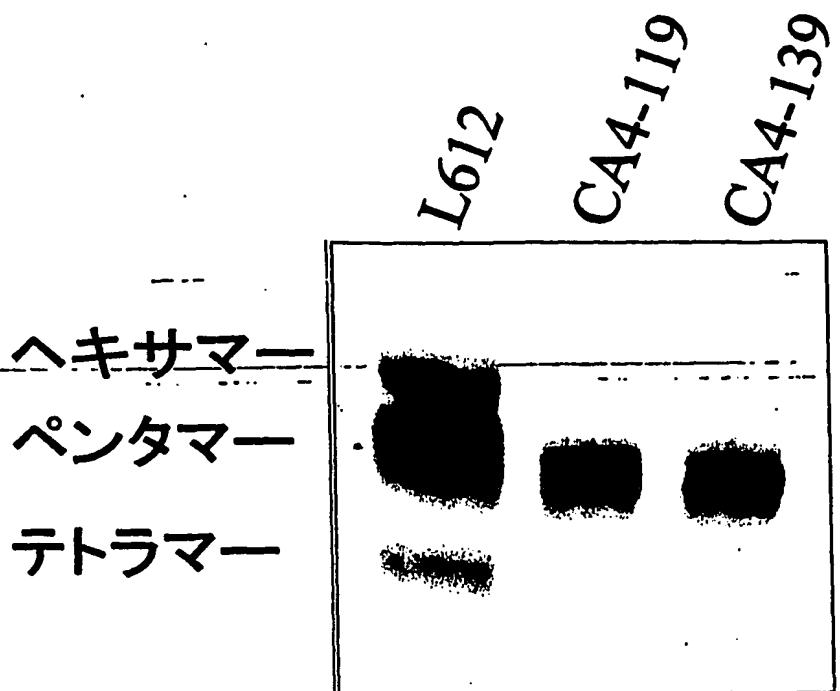
3 / 5

図 3



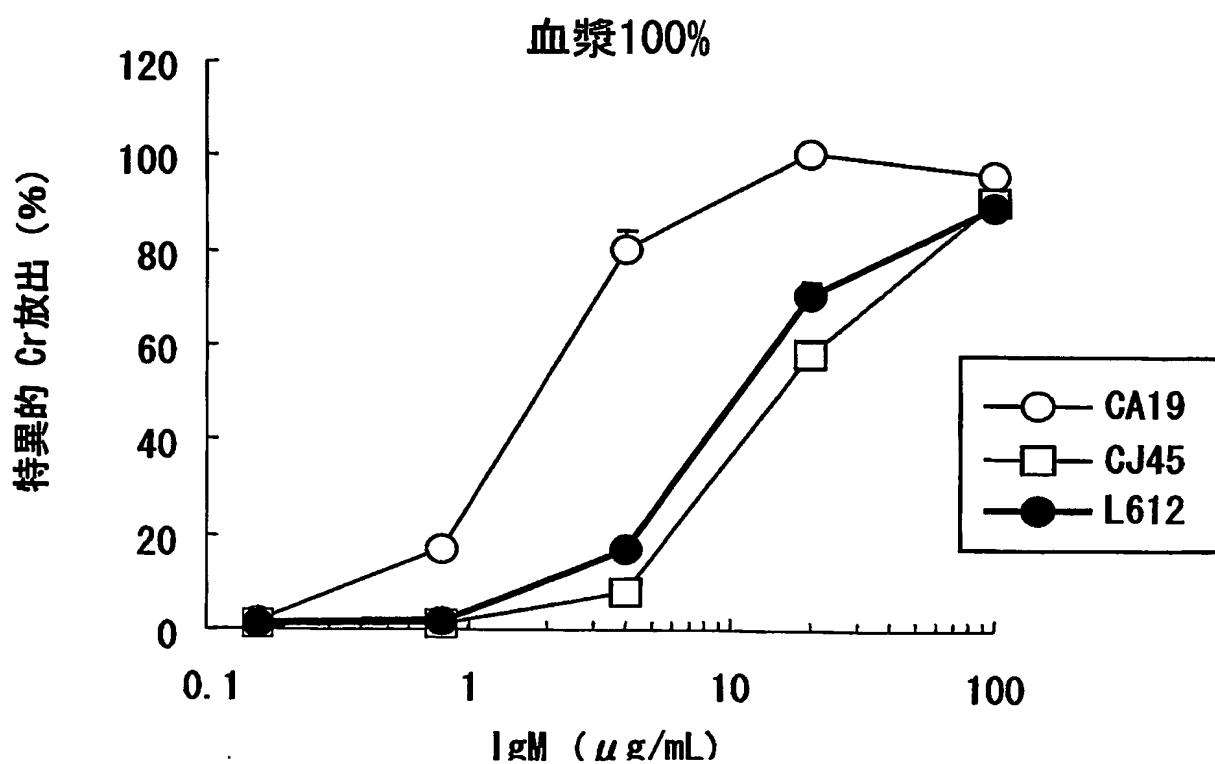
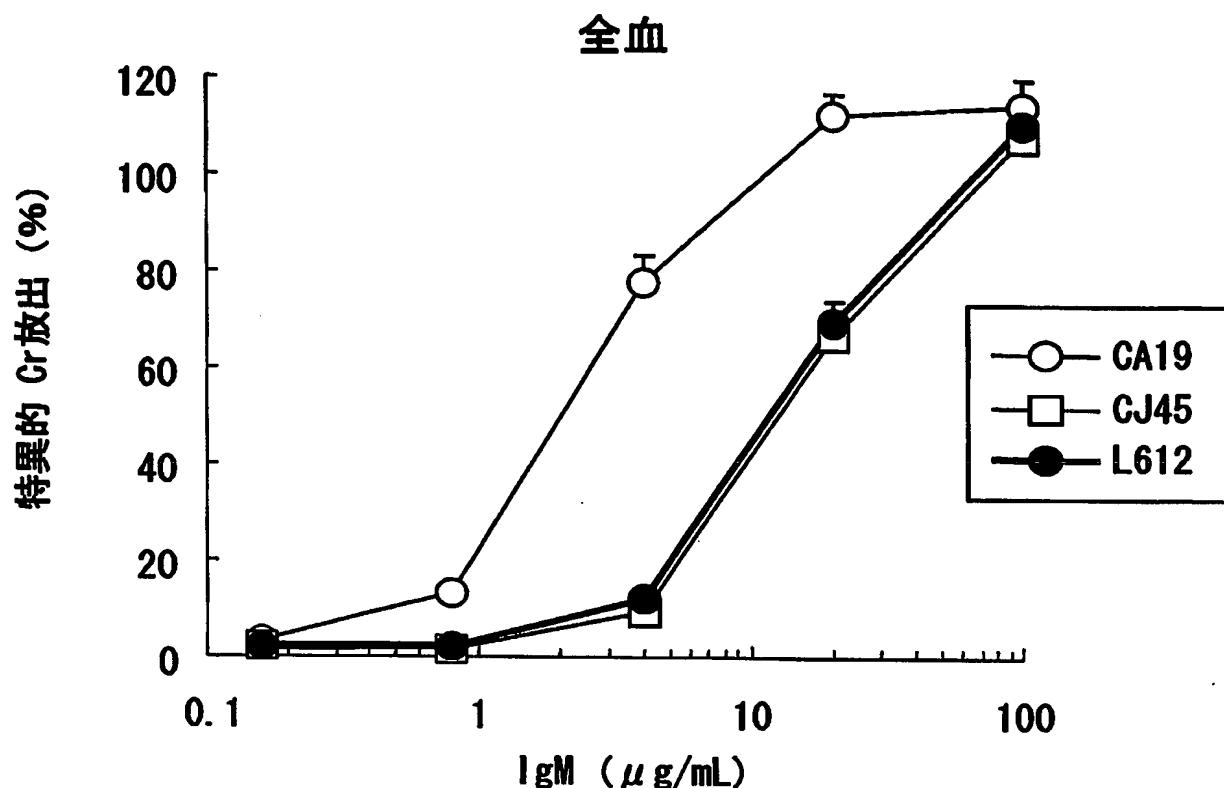
4 / 5

図 4



5 / 5

図 5



1 / 4 5

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

IRIE, Reiko

<120> Method for producing of IgM by transfect cells and determination thereof

<130> C1-A0223P

<150> US 60/487, 333

<151> 2003-07-15

<160> 31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1779

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1779)

<223>

2 / 45

&lt;400&gt; 1

atg gag ttt ggg ctg agc tgg ctt ttt ctt gtg gct att tta aaa ggt 48  
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg ttg gat tct ggg gga ggc ttg gta cag 96  
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
20 25 30

cct ggg ggg tgc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt 144  
Pro Gly Gly Cys Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

agc agc tgt gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 192  
Ser Ser Cys Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

gag tgg gtc tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca 240  
Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala  
65 70 75 80

gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aaa tcc aag aac 288  
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn  
85 90 95

3 / 45

acg ttg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta 336

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

tat tac tgt gcg aaa ggt ggc aac gat att ttg act ggt tat tat gct 384

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Asn Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Ala

115

120

125

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggg agt gca tcc gcc 432

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala

130

135

140

cqa acc ctt ttc ccc ctc gtc tcc tgt gag aat tcc ccg tcg gat acg 480

Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr

145

150

155

160

agc agc gtg gcc gtt ggc tgc ctc gca cag gac ttc ctt ccc gac tcc 528

Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser

165

170

175

atc act ttc tcc tgg aaa tac aag aac aac tct gac atc agc agc acc 576

Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr

180

185

190

cgg ggc ttc cca tca gtc ctg aga ggg ggc aag tac gca gcc acc tca 624

Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser

4 / 45

195	200	205	
cag gtg ctg ctg cct tcc aag gac gtc atg cag ggc aca gac gaa cac 672			
Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His			
210	215	220	
gtg gtg tgc aaa gtc cag cac ccc aac ggc aac aaa gaa aag aac gtg 720			
Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val			
225	230	235	240
cct ctt cca gtg att gct gag ctg cct ccc aaa gtg agc gtc ttc gtc 768			
Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val			
245	250	255	
cca ccc cgc gac ggc ttc ttc ggc aac ccc cgc aag tcc aag ctc atc 816			
Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile			
260	265	270	
tgc cag gcc acg ggt ttc agt ccc cgg cag att cag gtg tcc tgg ctg 864			
Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu			
275	280	285	
cgc gag ggg aag cag gtg ggg tct ggc gtc acc acg gac cag gtg cag 912			
Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln			
290	295	300	

5 / 45

gct gag gcc aaa gag tct ggg ccc acg acc tac aag gtg acc agc aca 960

Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr

305 310 315 320

ctg acc atc aaa gag agc gac tgg ctc ggc cag agc atg ttc acc tgc 1008

Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys

325 330 335

cgc gtg gat cac agg ggc ctg acc ttc cag cag aat gcg tcc tcc atg 1056

Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met

340 345 350

tgt gtc ccc gat caa gac aca gcc atc cgg gtc ttc gcc atc ccc cca 1104

Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro

355 360 365

tcc ttt gcc agc atc ttc ctc acc aag tcc acc aag ttg acc tgc ctg 1152

Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu

370 375 380

gtc aca gac ctg acc acc tat gac agc gtg acc atc tcc tgg acc cgc 1200

Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg

385 390 395 400

cag aat ggc gaa gct gtg aaa acc cac acc aac atc tcc gag agc cac 1248

Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His

6 / 45

405

410

415

ccc aat gcc act ttc agc gcc gtg ggt gag gcc agc atc tgc gag gat 1296  
Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp

420

425

430

gac tgg aat tcc ggg gag agg ttc acg tgc acc gtg acc cac aca gac 1344  
Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp

435

440

445

ctg ccc tcg cca ctg aag cag acc atc tcc cgg ccc aag ggg gtg gcc 1392  
Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala  
450 455 460

ctg cac agg ccc gat gtc tac ttg ctg cca cca gcc cgg gag cag ctg 1440  
Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu  
465 470 475 480

aac ctg cgg gag tcg gcc acc atc acg tgc ctg gtg acg ggc ttc tct 1488  
Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser  
485 490 495

ccc gcg gac gtc ttc gtg cag tgg atg cag agg ggg cag ccc ttg tcc 1536  
Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser  
500 505 510

7 / 45

ccg gag aag tat gtg acc agc gcc cca atg cct gag ccc cag gcc cca 1584

Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro

515

520

525

ggc cgg tac ttc gcc cac agc atc ctg acc gtg tcc gaa gag gaa tgg 1632

Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp

530

535

540

aac acg ggg gag acc tac acc tgc gtg gtg gcc cat gag gcc ctg ccc 1680

Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro

545

550

555

560

aac agg gtc acc gag agg acc gtg gac aag tcc acc ggt aaa ccc acc 1728

Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr

565

570

575

ctg tac aac gtg tcc ctg gtc atg tcc gac aca gct ggc acc tgc tac 1776

Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

580

585

590

tga

1779

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 592

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

8 / 45

&lt;400&gt; 2

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20

25

30

Pro Gly Gly Cys Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

Ser Ser Cys Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala

65

70

75

80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn

85

90

95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Asn Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Ala

115

120

125

9 / 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala

130

135

140

Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr

145

150

155

160

Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser

165

170

175

Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr

180

185

190

Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser

195

200

205

Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His

210

215

220

Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val

225

230

235

240

Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val

245

250

255

Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile

260

265

270

1 0 / 4 5

Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu

275

280

285

Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln

290

295

300

Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr

305

310

315

320

Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys

325

330

335

Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met

340

345

350

Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro

355

360

365

Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu

370

375

380

Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg

385

390

395

400

Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His

1 1 / 4 5

405

410

415

Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp

420

425

430

Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp

435

440

445

Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala

450

455

460

Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu

465

470

475

480

Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser

485

490

495

Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser

500

505

510

Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro

515

520

525

Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp

530

535

540

1 2 / 4 5

Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro  
545 550 555 560

Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr  
565 570 575

Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr  
580 585 590

<210> 3

<211> 723

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(723)

<223>

<400> 3

atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1

5

10

15

ggt gcc tac ggg gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct 96  
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

1 3 / 4 5

20

25

30

gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt 144  
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35

40

45

gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag 192  
Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50

55

60

aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 240  
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
65 70 75 80

gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat 288  
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
85 90 95

ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat 336  
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr  
100 105 110

tac tgt cag caa tat tat agt act cct ccg acg ttc ggc caa ggg acc 384  
Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
115 120 125

1 4 / 4 5

aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 432  
Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

130 135 140

ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc 480  
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
145 150 155 160

ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg 528  
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
165 170 175

gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag 576  
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
180 185 190

gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc 624  
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
195 200 205

aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat 672  
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
210 215 220

cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 720  
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5 / 4 5

225 230 235 240

tag 723

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 240

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp

1 6 / 4 5

85

90

95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr

100

105

110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr

115

120

125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

130

135

140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

145

150

155

160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

165

170

175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

180

185

190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

195

200

205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

210

215

220

17/45

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

240

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 480

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(480)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

atg aag aac cat ttg ctt ttc tgg gga gtc ctg gcg gtt ttt att aag 48  
Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys  
1 5 10 15

gct gtt cat gtg aaa gcc caa gaa gat gaa agg att gtt ctt gtt gac 96  
Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp  
20 25 30

aac aaa tgt aag tgt gcc cgg att act tcc agg atc atc cgt tct tcc 144  
Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser

35

40

45

18/45

gaa gat cct aat gag gac att gtg gag aga aac atc cga att att gtt 192

Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val

50

55

60

cct ctg aac aac agg gag aat atc tct gat ccc acc tca cca ttg aga 240

Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg

65

70

75

80

acc aga ttt gtg tac cat ttg tct gac ctc tgt aaa aaa tgt gat cct 288

Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro

85

90

95

aca gaa gtg gag ctg gat aat cag ata gtt act gct acc cag agc aat 336

Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn

100

105

110

atc tgt gat gaa gac agt gct aca gag acc tgc tac act tat gac aga 384

Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg

115

120

125

aac aag tgc tac aca gct gtg gtc cca ctc gta tat ggt ggt gag acc 432

Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr

130

135

140

aaa atg gtg gaa aca gcc tta acc cca gat gcc tgc tat cct gac taa 480

Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

19/45

145 150 155

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 159

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys

1 5 10 15

Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp

20 25 30

Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser

35 40 45

Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val

50 55 60

Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg

65 70 75 80

Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro

85 90 95

20/45

Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn

100

105

110

Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg

115

120

125

Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr

130

135

140

Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

145

150

155

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 7

ccaacggcaa caaagaaaaag aacg

24

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

21 / 45

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 8

aacatgctct ggccgagcca gtcg

24

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 9

gcaagtccag ccagagtgtt ttat

24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

22/45

&lt;400&gt; 10

ctgtccttgc tgtcctgctc tgtg

24

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 11

aacagctcga gccaccatgg agtttgggct gag

33

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 12

agcggccagc cgcccccagc ctgtcgacag gc

32

23 / 45

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 13

atagaattcc accatgggtgt tgcagaccca gg

32

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 14

ggagcaggcg gccgcacttc tccctctaac

30

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

24/45

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 15

accattgaga accagatttg tgta

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 16

tgtgtagcac ttgtttctgt cata

24

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

25/45

&lt;400&gt; 17

atgaattcca ccatgaagaa ccatttgc

28

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 18

tatctagatt agtcaggata gcaggc

26

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1788

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1788)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 19

atg gag ttt ggg ctg agc tgg ctt ttt ctt gtg gct att tta aaa ggt

48

26 / 45

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20

25

30

ccg ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

agc agc tat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 192

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

gag tgg gtc tca gct att agt ggt agt ggt tat acc aca tac tac gca 240

Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala

65

70

75

80

gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85

90

95

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta 336

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

27 / 45

tat tac tgt gcc aaa aaa ccg ggg gac tat ggt tcg ggg agt tat tac 384

Tyr Tyr Cys Ala Lys Lys Pro Gly Asp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr

115

120

125

ctt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggg agt 432

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser

130

135

140

gca tcc gcc cca acc ctt ttc ccc ctc gtc tcc tgt gag aat tcc ccg 480

Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro

145

150

155

160

tcg gat acg agc agc gtg gcc gtt ggc tgc ctc gca cag gac ttc ctt 528

Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu

165

170

175

ccc gac tcc atc act ttc tcc tgg aaa tac aag aac aac tct gac atc 576

Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile

180

185

190

agc agc acc cgg ggc ttc cca tca gtc ctg aga ggg ggc aag tac gca 624

Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala

195

200

205

gcc acc tca cag gtg ctg ctg cct tcc aag gac gtc atg cag ggc aca 672

28/45

Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr

210

215

220

gac gaa cac gtg gtg tgc aaa gtc cag cac ccc aac ggc aac aaa gaa 720

Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu

225

230

235

240

aag aac gtg cct ctt cca gtg att gct gag ctg cct ccc aaa gtg agc 768

Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser

245

250

255

gtc ttc gtc cca ccc cgc gac ggc ttc ttc ggc aac ccc cgc aag tcc 816

Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser

260

265

270

aag ctc atc tgc cag gcc acg ggt ttc agt ccc cgg cag att cag gtg 864

Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val

275

280

285

tcc tgg ctg cgc gag ggg aag cag gtg ggg tct ggc gtc acc acg gac 912

Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp

290

295

300

cag gtg cag gct gag gcc aaa gag tct ggg ccc acg acc tac aag gtg 960

Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val

305

310

315

320

29/45

acc agc aca ctg acc atc aaa gag agc gac tgg ctc agc cag agc atc 1008

Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met

325

330

335

ttc acc tgc cgc gtg gat cac agg ggc ctg acc ttc cag cag aat gcg 1056

Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala

340

345

350

tcc tcc atg tgt gtc ccc gat caa gac aca gcc atc cgg gtc ttc gcc 1104

Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala

355

360

365

atc ccc cca tcc ttt gcc agc atc ttc ctc acc aag tcc acc aag ttg 1152

Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu

370

375

380

acc tgc ctg gtc aca gac ctg acc acc tat gac agc gtg acc atc tcc 1200

Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser

385

390

395

400

tgg acc cgc cag aat ggc gaa gct gtg aaa acc cac acc aac atc tcc 1248

Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser

405

410

415

gag agc cac ccc aat gcc act ttc agc gcc gtg ggt gag gcc agc atc 1296

30 / 45

Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile

420

425

430

tgc gag gat gac tgg aat tcc ggg gag agg ttc acg tgc acc gtg acc 1344

Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr

435

440

445

cac aca gac ctg ccc tcg cca ctg aag cag acc atc tcc cgg ccc aag 1392

His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys

450

455

460

ggg gtg gcc ctg cac agg ccc gat gtc tac ttg ctg cca cca gcc cgg 1440

Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg

465

470

475

480

gag cag ctg aac ctg cgg gag tcg gcc acc atc acg tgc ctg gtg acg 1488

Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr

485

490

495

ggc ttc tct ccc gcg gac gtc ttc gtg cag tgg atg cag agg ggg cag 1536

Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln

500

505

510

ccc ttg tcc ccg gag aag tat gtg acc agc gcc cca atg cct gag ccc 1584

Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro

515

520

525

31 / 45

cag gcc cca ggc cg<sup>g</sup> tac ttc gcc cac agc atc ctg acc gtg tcc gaa 1632

Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu

530

535

540

gag gaa tgg aac acg ggg gag acc tac acc tgc gtg gtg gcc cat gag 1680

Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu

545

550

555

560

gcc ctg ccc aac agg gtc acc gag agg acc gtg gac aag tcc acc ggt 1728

Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly

565

570

575

aaa ccc acc ctg tac aac gtg tcc ctg gtc atg tcc gac aca gct ggc 1776

Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly

580

585

590

acc tgc tac tga 1788

Thr Cys Tyr

595

<210> 20

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

32 / 45

&lt;400&gt; 20

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln

20

25

30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala

65

70

75

80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85

90

95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Lys Pro Gly Asp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr

115

120

125

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser

33 / 45

130

135

140

Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro

145

150

155

160

Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu

165

170

175

Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile

180

185

190

Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala

195

200

205

Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr

210

215

220

Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu

225

230

235

240

Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser

245

250

255

Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser

260

265

270

3 4 / 4 5

Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val

275

280

285

Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp

290

295

300

Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val

305

310

315

320

Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met

325

330

335

Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala

340

345

350

Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala

355

360

365

Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu

370

375

380

Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser

385

390

395

400

Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser

405

410

415

35 / 45

Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile

420

425

430

Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr

435

440

445

His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys

450

455

460

Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg

465

470

475

480

Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr

485

490

495

Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln

500

505

510

Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro

515

520

525

Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu

530

535

540

Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu

3 6 / 4 5

545

550

556

560

Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly

565

570

575

Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly

580

585

590

Thr Cys Tyr

595

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 726

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(726)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 21

atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1

5

10

15

37/45

ggt gcc tac ggg gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct 96

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

20

25

30

gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt 144

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35

40

45

gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag 192

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50

55

60

aaa cca gga cag cct cct aag ttg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 240

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65

70

75

80

gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat 288

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85

90

95

ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat 336

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr

100

105

110

tac tgt cag caa tat tat act act ctt ccg ctc act ttc ggc gga ggg 384

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Thr Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly

3 8 / 4 5

115	120	125	
acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc 432			
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile			
130	135	140	
ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg 480			
Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val			
145	150	155	160
tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag 528			
Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys			
165	170	175	
gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag 576			
Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu			
180	185	190	
cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg 624			
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu			
195	200	205	
agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc 672			
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr			
210	215	220	

3 9 / 4 5

cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag 720  
His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu  
225 230 235 240

tgt tag 726  
Cys

<210> 22  
<211> 241  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22  
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala  
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
50 55 60

40/45

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65

70

75

80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85

90

95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr

100

105

110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Thr Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly

115

120

125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile

130

135

140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val

145

150

155

160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys

165

170

175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu

180

185

190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu

195

200

205

41/45

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr

210

215

220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu

225

230

235

240

Cys

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 23

caacaggcag gcagggcag caag

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

4 2 / 4 5

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 24

agcataatta aagccaaagga ggag

24

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 68

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 25

cctgatcatg aagacgtcga ctagtccgga tccccgggag ctcgagcgct ctagatctt 60

aattaagg

68

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 76

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

4 3 / 4 5

&lt;400&gt; 26

cgcgcccttaa ttaaagatct agagcgctcg agctccgggg gatccggact agtcgacgta 60

ttcatgatca ggccgg 76

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 27

gaggaattcc accatgaaga acc 23

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 28

4 4 / 4 5

gaggcggccg cttagtcagg atagcag

27

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 29

aaaagcggcc gcgatcataa tcagccatac ca

32

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 30

aaaactcgag aagcttagac atgataagat acattg

36

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 12

4 5 / 4 5

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized linker sequence

<400> 31

cccggtatccg gg

12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/010444

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

 Int.C1' C12N15/13, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, A61K39/395,  
 G01N33/561, G01N33/53, G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

 Int.C1' C12N15/13, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, A61K39/395,  
 G01N33/561, G01N33/53, G01N27/447

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 JST PLUS, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hisato TACHIBANA et al., "Mouse Fukko B-1 Saibo ni okeru joining chain Idenshi no Hatsugen", Nichidai Shigaku (2002), Vol.76, No.5, pages 425 to 433, page 428, right column, line 13 to page 430, left column, line 4	1-8
Y	STOLL T.S., Effects of culture conditions on the production and quality of monoclonal IgA., Enzyme Microb Technol (1997), Vol.21, No.3, pages 203 to 211, page 207, tables	1-8
A	MAYUS J.L., Inhibition of in vitro anti-DNA B-cell responses by cyclosporine, Cell Immunol. (1985), Vol.94, No.1, pages 195 to 204	1-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

 See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search  
 05 October, 2004 (05.10.04)

 Date of mailing of the international search report  
 26 October, 2004 (26.10.04)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/010444

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STOCK S.J., Production and isolation of large quantities of monoclonal antibody using serum-free medium and fast protein liquid chromatography, Hybridoma (1989), Vol.8, No.2, pages 241 to 247	1-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/010444

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - a sequence listing
    - table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - in written format
    - in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing
    - contained in the international application as filed
    - filed together with the international application in computer readable form
    - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/010444

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

There is no matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2 common to the inventions according to claims 1 to 8, claims 9 to 33, claims 34 and 36 to 40, claims 35 to 40, claims 41 and 43 to 48, claims 42 to 48, claims 49 and 52, claims 50, 51 and 53 and claims 54 to 65, either each other or all of these invention groups. Thus, no technical relevancy can be found out among these different groups of inventions in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it is obvious that the inventions according to claims 1 to 65 do not comply with the requirement of unity of invention.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1 to 8.

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N15/13, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,  
A61K39/395, G01N33/561, G01N33/58, G01N27/447

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N15/13, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,  
A61K39/395, G01N33/561, G01N33/58, G01N27/447

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JSTPLUS, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	立花寿人他, マウス腹腔B-1細胞におけるjoining chain遺伝子の発現, 日大歯学 (2002), Vol. 76, No. 5, p. 425-433 428頁右欄13行～430頁左欄4行参照	1-8
Y	STOLL T. S., Effects of culture conditions on the production and quality of monoclonal IgA., Enzyme Microb Technol (1997), Vol. 21, No. 3, p. 203-211 207頁table1参照	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に旨及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上との文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

05.10.2004

## 国際調査報告の発送日

26.10.2004

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B 9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	MAYUS J. L., Inhibition of <i>in vitro</i> anti-DNA B-cell responses by cyclosporine, <i>Cell Immunol.</i> (1985), Vol. 94, No. 1, p. 195-204	1-8
A	STOCKS S. J., Production and isolation of large quantities of monoclonal antibody using serum-free medium and fast protein liquid chromatography, <i>Hybridoma</i> (1989), Vol. 8, No. 2, p. 241-247	1-8

## 第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ  配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット  書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 第二欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第三欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-8, 請求の範囲9-33, 請求の範囲34, 36-40, 請求の範囲35-40, 請求の範囲41, 43-48, 請求の範囲42-48, 請求の範囲49, 52, 請求の範囲50, 51, 53, 請求の範囲54-65に係る発明群の相互または全てにPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項は存在しないので、これら相違する発明群の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見出すことはできない。

よって、請求の範囲1-65に係る発明は発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-8

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。